

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-58077

⑬ Int. Cl.	識別記号	序内整理番号	⑭ 公開 昭和60年(1985)4月4日
C 12 N 15/00		7115-4B	
C 07 H 21/04		7252-4C	
C 07 K 13/00		6464-4H	
C 12 N 11/16		6712-4B	
C 12 P 21/02		7235-4B	※審査請求 未請求 発明の数 21 (全38頁)

⑮ 発明の名称 GAL1酵母菌プロモーターの使用

⑯ 特願 昭59-35472

⑰ 出願 昭59(1984)2月28日

優先権主張 ⑯ 1983年2月28日 ⑮ 米国(US) ⑯ 470911

⑯ 発明者 デヴィッド・ボットス アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02146、ブルックリン、パーク・ストリート 80
 テイン

⑯ 発明者 ロナルド・ウェイン・デイヴィス アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025、メンロ・パーク、コンコード・ドライブ 418

⑯ 出願人 コラボラティヴ・リサーチ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02173、レキシントン、スプリング・ストリート 128

⑯ 代理人 弁理士 佐々木 清隆 外3名
 最終頁に続く

明細書の添付(内容に変更なし)
 明細書

1. 発明の名称

GAL1酵母菌プロモーターの使用

2. 特許請求の範囲

1) 酵母菌体中の遺伝子の出現を指示するガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子に連結した

GAL1プロモーターを含有することを特徴とするDNA分節。

2) 前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

3) 前記遺伝子がインターフエロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

4) 前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

5) 前記遺伝子がブレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

6) 前記GAL1プロモーターが755塩基対DNA配列であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

7) 前記GAL1プロモーターが820塩基対DNA配列であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節。

8) 所望のタンパク質を出現させるために使用するDNA分節に連結したGAL1プロモーター。

9) GAL1プロモーターをDNA分節中に導入し、この分節が染色体あるいは媒介体中の遺伝子に該染色体あるいは媒介体が複製され細胞によつてその遺伝子情報の一部として運ばれその遺伝子が出現されるような方法で連結されることから成ることを特徴とする酵母菌中にポリペプチドを出現させる方法。

10) 前記遺伝子が酵母菌ゲノムにとつて異質であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

11) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンで前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であること

特開昭60-58077(2)

を特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

12) 特許請求の範囲第11項の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

13) 前記ポリペプチドがインターフエロンであり、前記遺伝子がインターフエロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

14) 特許請求の範囲第13項の方法により製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

15) 前記ポリペプチドがプロレンニンであり前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

16) 特許請求の範囲第15項に記載の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

17) 前記ポリペプチドがプレプロレンニンで前記遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

18) 特許請求の範囲第17項に記載の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

19) 前記酵母がサツカロミセス・セレビジエ

株であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

20) DNA分節が酵母菌体に入れられ、この酵母菌体をグルコースを含有する培地で培養するがこの場合に前記酵母菌体は前記グルコースを代謝作用で変化させ、次に前記菌体が前記ポリペプチドを培地にガラクトースが存在するときに出現させることを特徴とする酵母菌ゲノムに異質の遺伝子に連結したDNA分節中のGAL1プロモーターを使用して酵母菌中にポリペプチドを得る方法。

21) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンで、前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲20項に記載の方法。

22) 前記ポリペプチドがインターフエロンで、前記遺伝子がインターフエロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

23) 前記ポリペプチドがプロレンニンで、前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

24) 前記ポリペプチドがプレプロレンニンで、前記遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

25) 受入れ番号20643、菌株名称CGY196でアメリカン・タイプ・カルチャーロコレクションに預けられている酵母菌株。

26) 受入れ番号202661、菌株名称CGY457、でアメリカン・タイプ・カルチャーロコレクションに預けられた酵母菌株。

27) 受入れ番号20662、菌株名称CGY461でアメリカン・タイプ・カルチャーロコレクションに預けられた酵母菌株。

28) 受入れ番号20663、菌株名称CGY528でアメリカン・タイプ・カルチャーロコレクションに預けられた酵母菌株。

29) 合成DNA配列

P_{GAL1}-A₆CCCGGGATCTCGACC-ATG-X

(Xはガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子。)

30) 合成DNA配列

P_{GAL1}-TTATTGCTCTACCGGATCAA-ATG-X

(Xはガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子。)

31) DNA組換え配列

P_{GAL1}-A₆CCCGGGATCTCGACC-ATG-X.

(P_{GAL1}はガラクトキナーゼのGAL1プロモーターの820塩基対DNA配列であり、Xは酵母菌に出現されるポリペプチドのDNA配列である。)

32) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンであることを特徴とする特許請求の範囲31に記載のDNA組換え配列。

33) 前記ポリペプチドがインターフエロンであることを特徴とする特許請求の範囲31に記載のDNA組換え配列。

34) 前記ポリペプチドがプロレンニンであることを特徴とする特許請求の範囲第31項に記載のDNA組換え配列。

35) DNA組換え配列

P_{GAL1}-TTATTGCTCTACCGGATCAA-ATG-X.

(P_{GAL1}はガラクトキナーゼのGAL1プロモーターの755塩基対DNA配列であり、Xは酵母菌に

特開昭60- 58077 (3)

出現されるポリペプチドのDNA配列である)。

36) 前記ポリペプチドがプレプロレンニンである特許請求の範囲第35項に記載のDNA組換え配列。

37) 异質の遺伝子に連結されたガラクトキナーゼ遺伝子の調節された主なメセンジャーRNAの写しのためのプロモーターを運ぶ酵母菌ゲノムから誘導されたGAL1プロモーターから成るDNA分節。

38) 前記異質の遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

39) 前記異質の遺伝子がインターフエロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

40) 前記異質の遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

41) 前記異質の遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37

項に記載のDNA分節。

42) 前記GAL1プロモーターが0.82キロベースDNA配列を有することを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

43) 前記GAL1プロモーターが0.755キロベースDNA配列を有することを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

44) Pvu IIの位置に酵母菌の写し開始位置を有する酵母菌2μプラスミドの断片、およびEco RIの位置にGAL1プロモーターを有する酵母菌染色体DNAからの断片から成る変形箇所を有するプラスミドYI_p5から成るプラスミド。

45) 前記GAL1プロモーターに連結したウシ成長ホルモン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

46) 前記GAL1プロモーターに連結したインターフエロン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

47) 前記GAL1プロモーターに連結したプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請

求の範囲第44項に記載のプラスミド。

48) 前記GAL1プロモーターに連結したプレプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

49) Eco RIの位置にGAL1プロモーターを有する酵母菌染色体DNAからの断片からなる変形箇所を有するプラスミドYI_p5から成ることを特徴とするプラスミド。

50) 酵母菌中の選択用遺伝子がUra3遺伝子から成るDNA分節であることを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

51) 前記GAL1プロモーターに連結したウシ成長ホルモン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

52) 前記GAL1プロモーターに連結したインターフエロン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

53) 前記GAL1プロモーターに連結したプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

54) 前記GAL1プロモーターに連結したプレプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

55) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20643、菌株名称CGY196の酵母菌中に見出されたDNA組換え物質。

56) 前記物質がウシ成長ホルモン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第55項に記載のDNA組換え物質。

57) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20661、菌株名称CGY457の酵母菌株中に見出されたDNA組換え物質。

58) 前記物質がインターフエロン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第57項に記載のDNA組換え物質。

59) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20662、菌株名称CGY461の酵母菌株中に見出されたDNA組換え物質。

特開昭60- 58077 (4)

60) 前記物質がプロレンニン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第59項に記載のDNA組換え物質。

61) アメリカン・タイプ・カルチャーレ
クション受入れ番号 20663、菌株名称 CGY528
の酵母菌中に見出された DNA 組換え物質。

62) 前記物質がブレプロレンニン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第61項に記載のDNA組換え物質。

63) 酵母菌およびバクテリアに挿入可能であることを特徴とする酵母菌ゲノムへ異質の遺伝子に連結したGAL1プロモーターを運ぶ媒介。

64) 前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

65) 前記遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

66) 前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

67) 前記遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

68) 下記のウシ成長ホルモン・ヌクレオチド配列から成ることを特徴とする DNA 組換えを物理：

69) 特許請求の範囲第6-8項に記載のヌクレオチド配列の酵母菌中に出現して生成されることを特徴とするポリペプチド生成物。

70) 前記GAL1プロモーターが下記のヌクレオチド配列を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA分節：

```

      10      20      30      40      50      60      70
GAATTGACAGGTTATCAGCAACACAGTCATATCCATTCTCAATTAGCTCTACCACAGTOTGTAAACCAA

      80      90     100     110     120     130     140
TOTATCCAGCACCACCTOTAACCAAAACAATTAGAAAGTACTTTCACTTTCTAATTAACTGAGCTOTCATTTA

      150     160     170     180     190     200     210
TATTGAATTTTCAAAAATTCTTACTTTTTTGGATGGACGCAAAGAAAGTTAATAATCATATTACATG

      220     230     240     250     260     270     280
OCATTACCAACCATATACATATCCATATACTACATATCCATATCTAACTCTACTATATTTGTTGTTAATAAAGA

      290     300     310     320     330     340     350
CCCCCATATCTTACGCTAAAAAAACCTCTCTTGGAACTTTCAATAACGCTTAACTGCTCATTGCT

      360     370     380     390     400     410     420
ATATTGAAAGTACGGATTAGAAGCCGCCQAGCGGGTGAACAGGCCCTCCGAAAGGAAGACTCTCTCCGCTGCT

      430     440     450     460     470     480     490
CCTCGTCTTCACCGGTCCCGTTCTGAAACCGCAQATGCGCTCGCCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGA

      500     510     520     530     540     550     560
TTCTACAACTACTAGCTTTATGGTTGAAAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCACAAACCTCTCAA

      570     580     590     600     610     620     630
ATQAACCGAAATCAAATTAAACACCATAAGGATGATAATGCGATTAGTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAAT

      640     650     660     670     680     690     700
TAATCAACGAAACGATGATTTTGATCTATTAAACAGATATATAAATGCAAAACTGCATAACCACTTTAA

      710     720     730     740
CTAATACTTTCAACATTTCGGTTGATTACTCTTCTATTCAAAATGAAACAAACAAAAATT

      750     760     770
GTTAATATACCTCTATACCTTAACGTCAGGAGAAAAACCCCGATCC
      780     790     800     810     820

```

3. 発明の詳細な説明

DNA組換え工業技術の発展により種々な遺伝子の自然な遺伝情報指定配列を有するバクテリアの無性生殖が可能になった。〔スイバード P.H.、シャイン J.、マーシャル J.A.、バクスター J.D.、およびグッドマン H.M.、「ネイチャー 270」、486-494、(1977)、および、シャイン J.、スイバード P.H.、マーシャル J.A.、バクスター J.D.、およびグッドマン H.M.、「ネイチャー 270」、494-499(1977)；ケシエット E.、ロズナー A.、バーンスタイン Y.、ゴレツキ M.、およびアビブ H.、「核酸研究」9、19(1981)；ミラー W.L.、マーシャル J.A.、およびバクスター J.D.、「J.生化学」255、7521-7524(1980)参照。〕最近ではDNA組換え工業技術において異質のタンパク質が酵母菌の中で無性生殖され出現したことが記載されている。酵母菌の中に異質の遺伝子が出現したことの証拠は、酵母菌プラスミド媒介体上のサツカロミセス・セレビジエの中に導入されたうさぎのグ

ロビン遺伝子の生体内での写しに関する研究から明らかにされた。〔ペックズ J.D.、ヴァン・デン・バーグ J.、ヴァン・オビエン A.、およびワイスマン C.、「ネイチャー 283」835-840(1980)参照。〕

酵母菌の中に異質の遺伝子を最大限に出現させてみようとして、遺伝子の5'-プロモータ領域、移動開始および信号ペプチド配列が酵母菌ゲノムの類似の領域と取り換えられた。ウシの成長ホルモンに関する、上記領域が酵母菌アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)遺伝子の領域と取り換えられた。完全な長さをもつた生物学的に活動的なウシの成長ホルモン分子が酵母菌の中に生成された。〔ハイツツマン R.A.、ハギイド E.、レバイン H.L.、ゴーテル D.V.、アンマーラー G.、ホール B.D.、「ネイチャー 295」717-722(1981)参照。〕他のプロモーターも使用されたが、遺伝子の出現はすつと少なかつた。一個の強力なプロモーターを有する能力が酵母菌の中に種々な遺伝子をかなりの水準で出現させることができた。

できるのに非常に役立つている。

GAL1ガラクトキナーゼ遺伝子のためのプロモーターが上記のようなプロモーターであることが発見された。さらにこのプロモーターはグルコース抑制下にある。従つて、ウシの成長ホルモン、インターフエロン、プレプロレニン、およびプロレニンを含む種々の遺伝子のいずれも酵母菌に無性生殖させ、酵母菌のGAL1プロモーターの指示により最大限に出現させることができて実用化している。

本発明の目的は所望のタンパク質を出現させるために使用する酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子のGAL1プロモーターを有する遺伝組換え物質を提供することである。

本発明のもう一つの目的はガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子が酵母菌の菌体の中に出現することを指示するためにこの遺伝子に結合したGAL1プロモーターを有するDNA分節を提供することである。

本発明のさらに別の目的はウシの成長ホルモン、インターフエロン、プロレニン、プレプロレニン、

又は他のポリペプチドをこれに相当するウシの成長ホルモン遺伝子、インターフエロン遺伝子、プロレニン遺伝子、プレプロレニン遺伝子、又は他の遺伝子に結合したGAL1プロモーターを使用して酵母菌の菌体の中に出現させる方法を提供することである。

本発明の別の目的は酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子のGAL1プロモーターに制御されて所望のポリペプチド生成物を生成するサツカロミセス・セレビジエの変種株を提供することである。

本発明の別の目的はGAL1プロモーターを使うDNA組換え工業技術により酵母の中に例えばウシの成長ホルモン、インターフエロン、プロレニン、プレプロレニンなどの生成物を生成する方法を提供することである。

本発明により、所望のポリペプチド生成物を得るために遺伝子の出現は例えばサツカロミセス・セレビジエのような酵母菌株のGAL1プロモーターにより制御される。GAL1プロモーターは酵母菌中のガラクトキナーゼのための写し開始信号を

含むDNA分節である。GAL1プロモーターの配列情報は第一表に示される。

第 1 表

GAL125 および GAL126 の配列のリスト

10	20	30	40	50	60	70
0AATTCCACAGGTTATCACCCAAACACAACTCATATCCATTCTCAATTAGCTCTACCAACACTGTTGAAACCAA						
80	90	100	110	120	130	140
TOTATCCAGCACCCTGTTAACCAAAACAAATTAGAAAGTACTTTCACTTGTAACTGAGCTGTTCATTTA						
150	160	170	180	190	200	210
TATTAATTTCAAAAATTCTTACTTTTTGGATGGACGCAAAGAAGTTAACATATTACAT						
220	230	240	250	260	270	280
GCATTACCAACATACATATCCATATACATATCCATATCTAACTATATGTTGTTGTTAAAGA						
290	300	310	320	330	340	350
GCCCCATTATCTTAGCCCTAAAAAAACCTTCTTGGAACTTCACTGTTAACGCTTAACGCTCATGCT						
360	370	380	390	400	410	420
ATATTOAACTACGGATTAGAAGCCGCGAAGCGGGTGACAACCCCTCCGAAAGAAGACTCTCCCTCCGTCGT						
430	440	450	460	470	480	490
CCTCGCTTTCACCGGTCGCGCTTCTGAAACGCAGATGCTCGCGCCGCACTGCTCCGAAACAATAAGA						
500	510	520	530	540	550	560
TTCTACAACTACTAGCTTTATGTTTAAAGAAGAAAATTGCGAACTGGCCCCACAAACCTTCAA						
570	580	590	600	610	620	630
ATGAAACGAAATCAAATTAAACACCATAAGGATGATAATGCGAACTGTTAGCCTTATTTCTGGGGTAAT						
640	650	660	670	680	690	700
TAATCAAGCGAAGCGATGATTTTGATCTATTAAACAGATATATAATGCAAAACTGCATAACCACTTAA						
710	720	730	740	750		
CTCTACCGGATCC [GAL126]						
CTAATACTTCAACATTTGCGTTTGTATTACTTCTTATT						
AAATGTTAAACGAAATCAACAAAAAATT						
760	770	780	790	800	810	820
GTAAATATACCTCTATACTTTAACGTCAGGAGAAAAACCCCGATCC [GAL125]						

特開昭60- 58077(8)

上記の特徴を有する酵母菌株の構造は大規模な酵母発酵技術が存在するし、またサツカロミセス・セレビジエが低毒性でもあるのでポリペプチド生成物の商業的生産には特に望ましい。

ここに記載の遺伝子工学の方法によつて用意された微生物としては、メリーランド州ロツクビル市パークローン・ドライブ 12301 のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに現在預けてある培養菌が挙げられる。これらの培養菌は、コラボラティブ・リサーチ社に預けられ、次のようなものがある。

受入れ番号 20643、株名称 CGY196、

預けた日 1982年9月。

受入れ番号 20661、株名称 CGY457、

預けた日 1983年2月。

受入れ番号 20662、株名称 CGY461、

預けた日 1983年2月。

受入れ番号 20663、株名称 CGY528、

預けた日 1983年2月。

酵母菌体中の遺伝子の出現を指示するための酵

母菌ゲノムにとつて異質の遺伝子に結合したGAL1プロモーターを含むDNA分節が提供される。この分節はGAL1遺伝子をmRNAに写し、次にこのmRNAを移動させる信号を有する酵母菌ゲノムから取つた0.755、又は0.82キロベースDNA分節であることが好ましい。このDNAの切片にはガラクトキナーゼの遺伝情報を指定する配列は存在しない。

酵母菌の中に所望のポリペプチド生成物を出現させる方法では、酵母菌GAL1プロモーターは生体内で染色体あるいはプラスミドに含まれるこのポリペプチド生成物の遺伝子の前に挿入される。これら媒介体は菌体を別のものにするために使用され、この新しい遺伝情報はその菌体の中に保持されその子孫に伝えられる。

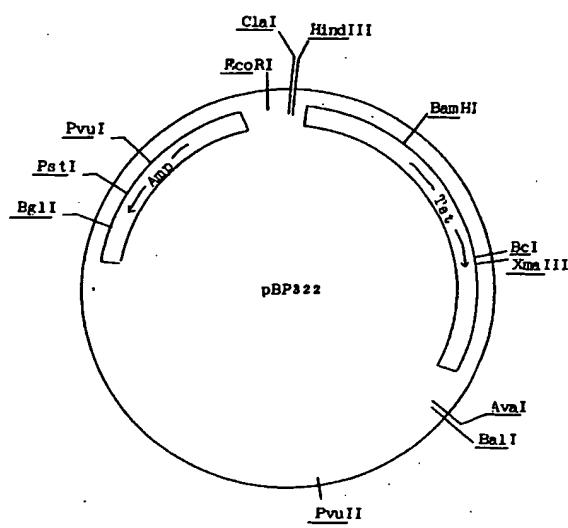
GAL1プロモーターを使うポリペプチド生成物の合成は次のいくつかの理由で有益である、すなわち、

GAL1プロモーターは強力で、かなりの量のポリペプチド生成物の合成をもたらす。

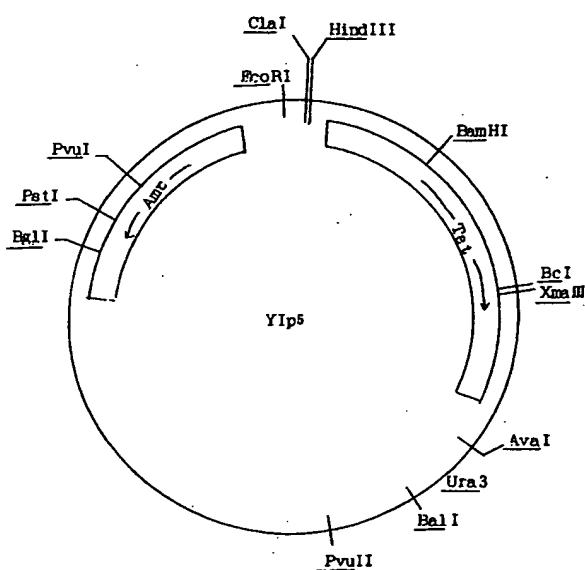
GAL1プロモーター活性は、過度のポリペプチド生成物が菌体にとつて毒性があるので、ポリペプチド生成による有害な影響を及ぼさないで、酵母菌を増殖させるための酵母菌の炭素源を変えることにより調節される。

以下に詳細に述べてあるように、特別のDNA分節は酵母菌ゲノムにとつて異質の遺伝子に結合され、サツカロミセス・セレビジエの変種株に入れられると、酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子のGAL1プロモーターの制御の下でポリペプチド生成物を生成する。このサツカロミセス・セレビジエは一般に新しいDNA組換えプラスミドで変えられる。このプラスミドは、エシエリキア・コリプラスミドpBR322、酵母菌ゲノムとプラスミドDNAのおよび合成のDNA連結子から取られたDNA分節を結合して作られた。J.G. サトクリフ、「コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム 43」77-90(1979)によるプラスミドpBR322の構造は第2表に図式で示されている。

第 2 表



第 3 表



ガーゼによつて結合してもよい。(スギノA.、
グッドマンH.M.、ヘイネットカーH.L.、シャイ
ンI.、ボイヤーH.W.、およびコツツアレリ
N.R.、「J.生化学 252」3987-3994
(1977)参照。)

丸い末端のDNAは例えばHaeIIIのような多数の制限エンドヌクレアーゼのいずれかで開裂により生成される。そもそも不ぞろいな切断、又は例えばEcoRI、HindIII、又はBamHIのような制限酵素によるくい違い切断などが使われるが、DNA末端は後で生化学的方法で丸くされなければならない。このような生化学的方法には単独成分特定ヌクレアーゼS1で培養する方法があるが、以下の記事に記載されている。すなわち、ニューブリッヂA.、シャインJ.、チャーウインJ.、ピクテットR.、タイシャーE.、ラツターW.J.、およびグッドマンH.M.、「サイエンス 196」1313(1977);マニアティスT.、ハージソンH.C.、レイシイE.、ロウアーG.、オコンネルC.、グオンD.、シムG.K.、およびエフスト

一般に、外生の遺伝子と結合するプラスミドを作る場合に、結合力のある末端を形成する、あるいは導入することを含めたさまざまな技術が使われる。丸くなつた末端が結合できる。もしくは、二つの鎖が別々の位置で開裂され、それぞれの端部に延長部分を残しておき結合力のある末端として役立つというような方法でプラスミドと遺伝子が開裂されてもよい。また結合力のある末端が二つの鎖の反対側の端部から核酸を取り除いて、あるいは反対側の端部に核酸を入れることによつて導入されてもよい。裂かれたDNA分節を結合するために使用される方法は、以下にも述べるようになし、末端の性質によつて左右される。

「丸くなつた末端」とは二個の塩基が一起になつた末端を有するDNA分子を指す。(スガラメラV.、ヴァン・デ・サンデJ.H.、およびコラナH.G.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス USA 67 1468-1475(1970)参照。)DNAの丸くなつた末端は約50μM DNA 5'-末端部の明白なkmを有するT₄DNAリ

ラティアディスA.、「細胞15」687,(1978);
 シエラーR.H.、トマスT.L.、リーA.S.、クレインW.H.、ナイルW.D.、ブリテンH.J.、およびダビドソンH.、「サイエンス196」197(1977);およびチャーネイP.、ペリコデットM.、ガリバートF.、およびティオレスP.、「核酸研究5」4479(1978)。もしくは、丸い末端はT₄DNAポリメラーゼで培養して割り出せるし〔イタクラK.、ヒロセT.、クリアR.、リツグズA.D.、ハイネツカーハ.L.、ポリバーF.、およびボイヤーH.W.、「サイエンス198」1056(1977);フレイザーT.H.およびブルースB.J.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・USA 75」5936(1978)参照〕、エシリキア・コリDNAポリメラーゼで培養しても割り出せるし〔スイバードP.H.、シャインJ.、マーシャルJ.A.、バクスターJ.D.、およびグッドマンH.M.、「ネイチャー270」486(1977);ヘックロンF.、ソーメ.、およびマクカーシーB.J.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエン

特開昭60- 58077(10)

ス USA75」 6012, (1978); およびパックマン K.、タツシユン M.、およびギルバート W.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス USA73」 4174 (1976) 参照)、および逆転写酵素で削り出せるが〔ユルブリッヂ A.、シャイン J.、チャーウィン J.、ピクトット R.、タイシヤー E.、ルツター W. J.、およびグッドマン H. M.、「サイエンス 196」 1313 (1977) 参照)、この際デオキシヌクレオチド・トリフォスフェートを添加する。

「結合力のある末端」とは、単独鎖維の末端を有する DNA 分子を指す。単独鎖維の延長は相互に補足し合い、逆平行である。〔メルツ J. E.、およびディビス R. W.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス・USA69」 3370-3374 (1972) 参照。〕

塩基対複合体の結合が起こるのは、5' 末端のヌクレオシドがリノ酸塩基を有し、この反対の補足的なヌクレオシドが遊離の 3'-ヒドロキシ基を有する場合である。2 個のホスホジエステル結合

がほとんど同時に行われ、結合した複合体は相互に転化されるヌクレオシド配列を有する。

DNA に結合力のある末端を創造するための 3 種類の一般的な方法がある。

1. 独自の配列のくい違い切断を導入する II 型制限エンドヌクレアーゼで DNA を消化する;
2. 線状の DNA 分子を末端デオキシヌクレオチド移転酵素で処理して、適当な割合で DNA 分子を有する 3'-ヒドロキシル末端でのポリ(dA) とポリ(dT) あるいはポリ(dC) とポリ(dG) のいずれか一方の単独鎖維の尾部を生成する;
3. 丸い末端の分子に連結子を加えるが、これは制限エンドヌクレアーゼ開裂位置を有する短い複合体である。このような連結子は T₄ DNA リガーゼ触媒化丸い末端結合によって DNA に結合される。この連結子を開裂する制限酵素で生成物を消化した後、この DNA は結合力のある末端を有する。

これらの方針は、次の記事に例示されるように周知のことである。すなわち、サドラー J. R.、ペッツ J. L.、ティクレンバーグ M.、ゴウデル D. V.、ヤンスラ D. G.、およびカルサーズ M. H.、「遺伝子 3」 211 (1978); パール C. P.、マリアン K. J.、ウー R.、スタウインスキ J. およびナラング S. A.、「遺伝子 1」 81. (1976); およびシェラー R. H.、ディツカーソン R. E.、ボイヤー H. W.、リツグズ A. D. およびイタクラ K.、「サイエンス 196」 177 (1977)。

「連結子」とは、長さが 6 から 14 の塩基対の複合した丸い末端の DNA 分子のこと、結合力のある末端を生成する制限エンドヌクレアーゼの認識位置を有する。

本発明の好ましい実施態様では、プラスミドは異質の遺伝子を酵母菌体に導入するための担体としての役割を果す。しかし、酵母菌に写しのできる分子ならどんなものでも使用できるので、プラスミドを使う必要はない。DNA 分子はプラスミド以外の媒介体に結びつけられるが、当該分野で

知られているものとしてウイルス、又はコスミドが挙げられるし、あるいは、染色体に結合することもできる。

組換えプラスミド、又はプラスミド・キメラは生体内で構成される。焼きなまして結紮する方法は組換えプラスミドを生成するばかりでなく、プラスミド担体を再び円形にするので、元のプラスミドと異質の DNA を含む結紮生成物の混合物が得られる。元のプラスミドとプラスミド担体および連続異質 DNA から成る DNA キメラとだけならば正常に複製をすることができるであろう。この混合物がバクテリアの変形のために使用される場合は、プラスミド担体の遺伝子型と異質の遺伝子型の両方の複製ができるであろう。

バクテリア菌体の変形はバクテリア菌体の混合物に起こるが、大部分は変形しない。変形した菌体の部分のはとんどが、あるいは、ある場合は少しだけが組換えプラスミドによつて変形されたと思われる。ともかく、菌体全体のうちの極めて僅かな部分だけが所望の表現型特徴を有する。

DNAキメラ、又は元のプラスミドを含むバクテリアだけを単離するために、例えば抗生物質や重金属に対する耐性などのように元のプラスミドに選択的に作用する遺伝子標識が含有される。次に、菌体は成長抑制物質を含有する寒天培地で培養される。本発明において変形のためのバクテリアとしてエシエリキア・コリが使用されるので、その成長抑制物としてアンピシリンが使用される。耐性のある遺伝子型を有する菌体だけが生き残る。もし異質の遺伝子がプラスミド担体によつて変形した菌体とプラスミドキメラによつて変形した菌体とを識別できる表現型特性を提供しない場合には、さらに複製されたプラスミドキメラを複製されたプラスミド担体から単離する工程が必要である。工程には、菌体の溶解および従来の方法によるDNAの単離分離あるいは変形バクテリアの無作為選択およびどの菌体が分子キメラを含有しているかを測定するため変形したものからDNAを識別することなどがある。これは電気泳動、傾斜遠心分離、配列分析、又は電子顕微鏡検査などに

よつてDNAを物理的に識別することによつて行われる。

種々のクローンから菌体が集められ、これら変形物からプラスミドDNAが単離される。次に、プラスミドDNAはいろいろな方法で分析される。一方法としては、プラスミドを適切な制限酵素で処理し、得られた切片に異質の遺伝子が存在するか分析する方法がある。その他の技術方法についてはすでに述べた。

ひとたび組換えプラスミドがエシエリキア・コリに複製され単離されると、このエシエリキア・コリは培養され増殖されるが、組換えプラスミドはサツカロミセス・セレビシエ株の変形用に使用される。

本発明で使われるGAL1プロモーターという用語はPGAL1とも表示されるが、このGAL1遺伝子をmRNAに写し、次にこのmRNAを移動させるための信号を有する酵母ゲノムから得られた0.755あるいは0.82キロベースのいづれかのDNA配列であるのが好ましい。ガラクトキナ-

ゼの遺伝情報を指定する配列はこのDNAの断片には存在しないが、この断片は異質遺伝子の出現を指示できるし、その規則はGAL1遺伝子の様態に従う。[St.ジョンT.P.およびディビスH.W.「J.モル・ビオロジイ 152」285-315 (1981) 参照。]

本発明で使用されるプロモーターによつて促進される前述のウシ成長ホルモン遺伝子は下垂体前葉製剤で合成された約22,000ダルトンのタンパク質である。このホルモンは成人前の成長に必要である。ウシ成長ホルモン(BGH)は、最初に26個のアミノ酸残基のアミの末端延長を有する前成長ホルモンとして合成された2個のジスルフィド橋を持つた191個のアミノ酸から成る単独のポリペプチドを含有している。[ミラーW.L.、マーシャルJ.A.およびバクスターJ.D.「J.生化学255」7521-7524(1980);ケシエットB.、ロズナーA.、バーンスタインY.、ゴレツキM.およびアビブH.「核酸研究9」19-30(1980);およびリンガツバV.R.、デ

ビラーシアリーA.、およびプロベルG.「プロセスナショナルアカデミーサイエンス USA 74」2432-2436(1977)参照。]

本発明で使用されるプロモーターによつて促進される前述のインターフエロン遺伝子は以下に記載の3種類のインターフエロン遺伝子のいづれのものでもよい。

(a) 白血球-白血球あるいはリンパ芽球細胞から誘導され、LeIFN又はIFN- α と表示される。

(b) 脲細胞-脢細胞から誘導され、IFNあるいはIFN- β と表示される。

(c) 免疫-分裂促進剤あるいは抗原刺激リンパ系細胞から誘導され、IFN- γ と表示される。このようなインターフエロンについての記載は以下の文献中に見られる。

ゴーデルD.V.、ラングD.W.、ドレルT.J.、グロスM.、ローンH.M.、マツカンドリスR.、スieberberg R.H.、ユルブリッヂA.、イエルバートンB.、およびグレイP.W.「ネイチャー290」20-26(1981)。

アレンG. およびファンタスK.H. 「ネイチャ-287」 408-411 (1980) および前出の文献。

ズーンK.G. 「サイエンス 207」 527-528 (1980)

マンティN. 、シユバーツスタイルM. 、ストローリM. 、バナムS. 、ナガタS. およびワイズマンC. 「遺伝子 10」 1-10 (1980)。

ストローリM. 、ナガタS. およびワイズマンC. 「サイエンス 209」 1343-1347 (1980)。

本発明の方法において、プレプロレンニンおよびプロレンニンはそれぞれプレプロレンニンDNA物質の単離によつて得られるのが好ましい。プレプロレンニンはプロレンニンの先行物質である。プレプロレンニンはNAの部分を除去することにより、プロレンニンの遺伝情報を指定する遺伝子物質を得ることができた。

本発明によるプレプロレンニンあるいはプロレンニン遺伝子はプレプロレンニンあるいはプロレ

ンニンそれぞれのアミノ酸配列の遺伝子情報を指定するスクレオチド配列から成り、プレプロレンニンあるいはプロレンニンをそれぞれ暗号に変えるゲノムDNAの中に存在する干渉スクレオチド配列は含まない。また、これらの遺伝子は適当な宿主細胞の中に複写する媒介体に附着して提供される。

本発明の目的のために、プロレンニン遺伝子はプロレンニン分子の遺伝情報を指定するスクレオチドの配列であると定義されるが、このアミノ酸配列は次の文献に記載されている〔B. ホルトマン、V.B. ベダーセン、H. ヤュブソン、D. カウフマン、およびG. ウィブレント 「プロセスナショナル アカデミーサイエンス USA 74」 2321-2324 (1977)〕。

プレプロレンニン遺伝子はプロレンニンの遺伝子情報を指定するスクレオチドの配列を有するが、また、プレプロレンニン酵素上に見られるアミノ末端先行物質ポリペプチドの遺伝子情報を指定するスクレオチドをさらに48個を5'-末端の位置

に有する。

本発明の好ましい実施態様において宿主細胞として使用された酵母菌株はサツカロミセス・セレビジエで、これは低毒性で周知の遺伝子特性を有するため普通に研究室で使われる菌株である。この菌株は大規模に培養するのが容易である。しかし、GAL1プロモーターを有する本発明の組換えDNA物質は、規則を変える酵母菌の突然変異体を含有するポリペプチド生成物を変形を可能にする酵母菌体内に出現させるために使用される。

サツカロミセス・セレビジエは多數の発芽細胞によつて無性再生する酵母菌である。このような細胞は通常は対になつて、あるいは小さな群をなしている。この種は通常は生殖細胞が直接無性的な細胞の中で生成する二倍体であるが、この種はまたより高い倍数性でも培養される。さらに、サツカロミセス・セレビジエは子のうを形成するが、各子のうの中に1から4個の球状の生殖細胞を有する。二種の子のうは成熟しても破れない。この酵母菌は呼吸代謝作用と同様に強力な発酵作用を

有する。選ばれた菌株には蒸留酒製造業者の酵母菌とパン屋の酵母菌がある。

酵母菌の大部分は比較的一様な条件で普通の研究室用培地で培養される。酵母菌の通常発育に必要なものは次の通りである。

- (a) 炭素とエネルギー用有機炭素化合物、
- (b) タンパク質と核酸の合成用の有機、又は、無機塩素、
- (c) 各種ミネラル(極微量の要素を供給する化合物を含む)、

(d) たびたび、ビタミンの混合物を添加。

このような発育に必要なものは酵母培養をベースにしたもの(ディフコから入手できるYNB)、すなわち、多數の微量要素、9種のビタミン、より好みする酵母菌の成長を刺激する極微量のアミノ酸、およびリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウムなどの主要ミネラルを含む化学的に定義された培地によつて与えられる。塩素源は硫酸アンモニウムである。所望の炭素源が添加されなければならないが、普通そ

特開昭60- 58077(13)

に記載の方法によりオリゴ(dT)セルロースでクロマトグラフィ分析をして得られる。

次に、このメッセンジャーRNAは従来の方法により二重鎖DNAに変換される。まず、DNAの見本がAMV逆転写酵素を使用するような従来の組換えDNA方法によつてメッセンジャーRNAから作られる。例えば、A. エフストラティアディス、F.C. カフアトス、A.M. マクサム、およびT. マニアティス、「細胞7」279-288(1976)、R. ヒグチ、G.V. パドック、R. ウオール、およびW. サルサー、「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 73」3146-3150(1976)、D.L. カシアン、およびJ.C. メイヤーズ「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA 73」2191-2195(1976)、M.P. ウィッケンズ、G.N. ブーエル、およびR.T. シムク「J. 生化学 253」2483-2495(1978)、G.M. ワール、H.A. バジェットおよびG.R. スタック、「J. 生化学 254」8679-8689(1979)に記載の方法がコピイ

の濃度は0.5-3%である。特に菌株に必要なものがあれば、この培地に添加される。培地のpHの範囲は普通pH 3-8である。好ましくは、pH 4.5-6.5である。

本発明の細胞を得るために先ず周知のDNA組換え技術を使つて所望の遺伝子物質を得て、これを宿主細胞に挿入し、その後、この宿主細胞は無性生殖される。

酵母菌の中に最後に無性生殖したい遺伝子は第一段階で第一の源からの遺伝子のメッセンジャーRNAを得ることにより単離されるのが好ましい。ウシ成長ホルモンの場合、これはウシ下垂体前葉製剤から単離して得られる。メッセンジャーRNAはディーリー外の方法(R.G. ディリー、J.I. ゴードン、A.T.H. パーンズ、K.P. ムリニツクス、M. ピナースタイン、H.F. ゴールドバーガー、「J. 生化学 252」8310-8319(1977))により単離され、ポリア強化RNAは、R.C. デスロジヤ、K.H. フリドリチ、およびF.M. ロットマン、「生化学 14」4367-4374(1975)

DNA(cDNA)を得るために使用される。RNA部分は上記方法のいずれかを使つて当該技術で周知の方法により離離をつて、あるいはウイツケンズ外(1978)の方法により熱変性することによりきちんと並べられる。

次に、エシエリキア・コリDNAポリメラーゼIあるいはAMV逆転写酵素のような酵素を使用して、上記記載の方法およびJ.I. ゴードン、A.T.H. パーンズ、J.L. クリストマンおよびR.G. ディリー、「J. 生化学 253」8629-8639(1975)に記載の方法により、cDNAを二重鎖DNAに変換する。

第三に、合成連結子が従来の方法によりHind IIIあるいはEcoRI合成オリゴヌクレオチド連結子を使用して二重鎖DNAの両端に付けられるが、従来の方法としては例えば次のようなものがある。すなわち、R.H. シエラー、T.L. トマス、A.S. リー、W.H. クレイン、W.D. ナイルス、R.J. ブリテン、およびE.H. ダビドソン「サイエンス 196」197-200(1977)、T.H. フレイ

ーおよびB.J. ブルース「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA 75」5936-5940(1978)、A. ユルブリッヂ、J. シャイニン、J. テヤーダイン、R. ピクテット、B. タイシャー、W.J. ルツターおよびH.M. グットマン、「サイエンス 196」1313-1319(1977)、J. シャイニン、P.H. スイバーグ、J.A. マーシャル、J.D. バクスターおよびH.M. グットマン「ネイチャー 270」494-499(1977)、又はP.H. スイバーグ、J. シャイニン、J.A. マーシャル、J.D. バクスターおよびH.M. グットマン「ネイチャー 270」486-494(1977)。

第四に、DNA分子は染色体に合成されるか、あるいは当該技術で周知のプラスミド、ウイルス、又はコスミドなどの媒介介に付けられる。このような媒介介には次のようなものがある。

pBR322(F. ポリバー、H.L. ロドリグス、P.J. グリーン、M.C. ベトラッヂ、H.L. ヘイネカー、H.W. ポイヤー、J.H. クロサ、S. フォルコウ、1977「遺伝子2」95-119)

特開昭60- 58077(14)

pMB9 (R.L. ロドリグス、 F. ポリバラ、 H. M. グッドマン、 H.W. ポイヤー、 M.C. ベトラ ツチ 「遺伝子出現の制御における分子機構」 (D. P. ニールリツチ、 W.J. ラッター、 C.F. フォックス編集) 471 アカデミック出版ニューヨーク、 1976)

pSC101 (S.N. コーヘン、 A.C.Y. チャング、 H.W. ポイヤー、 R.B. ヘリング 1973 「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA70J 3240)

λ gtWES (D. テイミエ、 L. エングイスト、 P. レダー 「ネイチャー 263J 526-527 (1976) 」 シャロンフェイジス (F.R. ブラットナ、 外 「サイエンス 196J 161-169 (1977) 」)

r1R229 (J.D. ポエク 「分子一般遺伝学 181J 288-291) (1981))

pJC75-58 (J. コリンズ 「酵素化学の方法 68J 309-326) (1979))

この工程は再び最終宿主細胞の外側で行われる。この方法の後に立つ技術は以下の記載と同様に連

結子に関する上記文献に記載されている。すなわち、 V. ハーシフィールド、 H.W. ポイヤー、 C. ヤノフスキイ、 M.A. ロベット、 および P.R. ヘリンスキ 「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA 71J 3455-3459 (1974) 、 N.E. ムレイおよび K. ムレイ、「ネイチャー 251J 476-482 (1974) 、 F.H. ブラットナー 「サイエンス 196J 161-169 (1977) 」)

第五工程では、 DNA 組換分子は宿主細胞系の細胞質に従来の方法を用いて導入されるが、この方法については以下の記事に記載されている。すなわち、 M. マンデル、 および A. ヒガ (1970) 「J. 分子生物学 53J 159-162 、 P.C. ウェンスリンク、 D.J. フィネガン、 J.E. ドナルソン および D.S. ホグネス 「細胞 3J 、 315-325 (1974) 、 S.N. コーヘン、 A.C.Y. チャング および L. スー 「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA69J 2110-2114 (1972) 、 H.M. グッドマン、 および R.J. マクドナルド 「酵素化学の方法 68J 75-90 (1979) 、 E.M.

レグーバーグおよび S.N. コーヘン、「J. バクテリア 119J 1072-1074 (1974) 」)

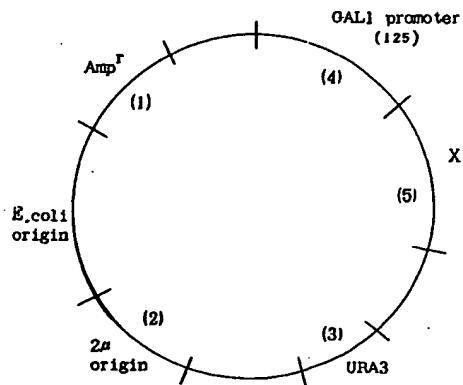
正確なクローニングであることの認識は交雑選択の方法あるいは合成オリゴヌクレオクドで精査することにより行われる。(T. タニグチ、 Y. フジイ、 クリヤマ、 および M. ムラマツ、「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA77J 4003-4006 (1980) 、 R.P. リツキヤルディ、 J.S. ミラーおよび B.E. ロバーツ、「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA76J 4927-4931 (1979) 、 D.L. モントゴメリ、 B.D. ホール、 S. ギラン、 および M. スミス 「細胞 14J 673-680 (1978) 」)

次に、新しく変えられた宿主細胞は無性生殖され、 所望の物質が出現した。 例えば、 ラクトース・オペロン・プロモーターを使うガレンテ外の方法で (1980) (L. ガレンテ、 G. ローラー、 T.M. ロバーツ、 および M. タツシン 「細胞 20J 543-553 (1980) 、 L. ガレンテ、 T.M. ロバーツ、 および M. タツシン 「科学 209J 1428-

1430 (1980)) 、 同質の DNA を出現させこれを最も効果的に活用する。

本発明において、 DNA 分節をプラスミド構造に並べたものが第 4 表に図式的に示される。

第 4 表



特開昭60- 58077(15)

この構造は、例えはエシエリキア・コリ、又は酵母菌のいずれか一方の中に保持されるプラスミドなどの「シャトル」媒介体で一般に使用されるいくつかの成分から成る。第4表に記載のプラスミドは、K. ストルール、D.T. スティンチコム、S. シヤーラー、およびR.W. ディビス「プロセス ナショナル アカデミー USA76」1035-1039(1979)に記載のプラスミドYI_p5の変形構造である(第3表参照)。分節(1)はプラスミド_pBR322の2.4キロベース断片で、DNA複製元とβ-ラクタメーゼ遺伝子を含有し、DNAをエシエリキア・コリに増殖させ、アンピシリン耐性によりDNAを選択的に存在させ続けることができる。分節(2)は酵母菌の中に最初に写しを開始する位置を有する酵母菌2μプラスミドの1.6キロベースのHpa IからHin IIIまでの断片である。[2μプラスミドについては、J.L. ハートレイおよびJ.B. ドネルソンにより「ネイチャー 286」860-865(1980)に記載されている。]分節(3)は酵母菌ゲノム(1.1 kbの長さ)からの

URA3遺伝子で、宿主株中のura3⁻の変形を補足するおかげでプラスミドを有する酵母菌を選択することができる。[URA3遺伝子については、M. パッハ、F. ラクロート、およびD. ポットスタンにより「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA76」386-390(1979)に記載されている。]

分節(4)は、GAL1遺伝子をmRNAに転写し次にこのmRNAを移動させる信号を有する酵母菌ゲノムから得られたDNAの0.755 kb、又は0.82 kbの断片である。このGAL1遺伝子は酵母菌が強化グルコース培地で培養される場合は抑制される。ガラクトキナーゼの遺伝情報指定配列は0.755 kb、又は0.82 kbの断片には存在しない。これらDNAの切片は異質の遺伝子の出現を指示でき、その規則はここに記載の通りGAL1遺伝子の構造に従う。

分節(5)は所望のポリペプチド生成物配列を暗号化するDNAの断片である。そのDNA切片は一定の方向を向いているので、mRNAの転写はGAL

1プロモーターによつて制御される。信号ペプチドの遺伝情報を指定する配列は取り除かれ、ATG移動開始コドンが挿入された。従つて、メチオニンによつて開始される遺伝子は研究用に使われる。

プラスミドは各種源および合成連絡子からDNA切片を結紮して構成される。0.82 kbのGAL1プロモーターと異質の遺伝子の配列の結合点での配列は次のとおりである。

(1) P_{GAL1}-A₆CCCCGGATCTCGACC-ATG-X
(Xは異質遺伝子である。配列 TCGACC は合成
Sal I 連絡子の一部であり、CCCGGGATC は Bam
H I 連絡子の一部である。)

0.755 kb のGAL1プロモーターと異質の遺伝子の配列の結合点での配列は次のとおりである。
P_{GAL1}-TTATTCGCTCTACCGGATCAA-ATG-X
(Xは異質の遺伝子である。)

プラスミドはまずエシエリキア・コリの中で無性生殖され増殖され、次に酵母菌の中で変形される。出現規律が類似の構造を使う各種遺伝子に関する測定された。ウシ成長ホルモンの場合は、例

えば、ウシ成長ホルモン lacZ の融合遺伝子は第3図でウシ成長ホルモン遺伝子に(X位置で)とつて代わつた。この構造は本質的にウシ成長ホルモンの全配列を有し(N-末端用の4アミノ酸の遺伝情報を指定する配列だけが欠けている)、ほとんど完全な lacZ 遺伝子を有する。β-ガラクトシダーゼ(lac Z 遺伝子生成物)活性を監視したところ、ほぼ80,000分子の融合タンパク質が菌株 CGY150(α-leu2-3 ura3-52 GAL⁺)中の細胞1個につき生成された。

酵母菌の中でポリペプチド生成物を生成する場合に許可できる変更は次のとおりである。

- ・違う末端材が使用できる。
- ・ウシ成長ホルモンに関して、N-末端アミノ酸はウシ成長ホルモンにとつて異種であり、フェニルアラニン(Phe)およびアラニンの両方が観察された。この異種混成は先行物分子(前成長ホルモン)の不明確な処理法の結果である。上記の遺伝子は Phe-BGH の遺伝情報を指定する。Ala-BGH の他の遺伝子も出現のために使

用できる。

- GAL1プロモーターの突然変異体（第4表の要素(4)）は出現の規準あるいは規則の様態に影響を与えることができる。染色体のゲノム中の他の突然変異体も同じ効果がある。事実、GAL1プロモーターが構成を開始させるのに役立つ突然変異体もある。このような菌株はより高い出現規準を得るために使用される。
- 異質の遺伝子に連結した P_{GAL1} を有する DNA 分節（第4表の要素(4)および(5)）は臨時染色体プラスミド上にこの分節を置くことよりむしろ安定した構造を得るために酵母菌染色体中に合体される。
- 異質の遺伝子中の ATG 開始コドンは信号ペプチドの遺伝情報を指定する配列などのような他の配列と取り代えられる。さらに、タンパク質が酵母菌体から培地へ分泌された。
- いろいろ長さや配列の違った DNA が GAL1 プロモーターと異質の遺伝子配列の結合点で生成の水準を最も効果的に活用するために使用され

る。例えば、配列(1)は次のように変えられた。

(1) P_{GAL1}-A₆CCCCGCAAGCTTATCG-ATG-X、

この領域の他の配列は突然変異誘発を行うことにより誘導される。

- 種々の長さの GAL1 プロモーターが使用できる。
- 酵母菌ゲノムからの転写用の末端材はウシ成長ホルモンの C-末端に加えられる。
- ここに使われている GAL1 プロモーターの用語は、酵母菌中にガラクトキナーゼの出現をうながす作用をする 0.755 あるいは 0.82 キロペースの DNA 配列の部分を指す。

ここに記載の酵母菌株は、培地にガラクトースが含まれる場合に所望のポリペプチド生成物を生成する。培地には 6.78/8 の酵母蛋白基剤、2% のガラクトース、および適切なアミノ酸が含まれる。もしそのポリペプチド生成物が宿主株に有害であるとわかつたら、酵母菌を 2% のグルコースと 6.78/8 の酵母蛋白基剤を含有する培地で培養し、次にその酵母菌をガラクトース培地に移して培養を止めた後でポリペプチド生成物の製造

を誘発することによって、ポリペプチド生成物の生成を抑制することができる。細胞は遠心分離され、細胞のない抽出液はガラスのビーズで激しくかき回して細胞をくだけて得られる。

例 1.

牛の成長ホルモンの製造

1. 牛の成長ホルモン mRNA の単離

牛の脳下垂体が牛の屠殺直後に集められて、それをドライアイスで直ちに凍結した。50 mM の Tris-HCl, pH 7.5, 8 M のグアニジン HCl および 1 mM のデチオスレイトールとから成る 200 ml の冷緩衝液 (10°C) の中に Waring ブレンダーを使用して 14.4 g の組織を粉碎して入れた。このようにして得られた溶液を次に、10,000 rpm の Sorval SA600 ローター中で 5°C の温度で 17 分間遠心分離した。分離した物質を再分散して均質化し、それは 20 mM の醋酸ソーダと 2.0 mM の EDTA とから成る 40 ml の冷緩衝液中で 1 時間氷を入れて静置された。それからその液はその半量の氷冷 100% エタノールで処理した。

-20°C で 1 時間放置後、沈殿物は -10°C の温度で 30 分間 3000 rpm の遠心分離を行つてペレット化した。このペレットは 20 ml の前述の緩衝液の中に 2 個再分散され、次にその半量の氷冷 100% エタノールで処理され、その後 -20°C で 1 時間培養された。ペレットは前述の方法で集められた。この最終ペレットを 8 ml の 0.1 M EDTA 中に 60°C で加熱しながら再分散し、次に 0.1 容積の 2 M 酢酸ソーダ、pH 5.0 と 2 容積の氷冷 100% エタノールとを加え、この溶液を -20°C で一晩放置した。この RNA 沈殿物は -10°C の温度で 20 分間の 8000 rpm 遠心分離によって集められて、次にそれを 5 ml の水に溶解した。収量は 5 mg RNA であった。この RNA 溶液は 5 ml の 2 倍濃厚結合緩衝液 (20 mM の Tris - HCl, pH 7.5; 2 mM の EDTA, pH 7.0; 0.4% SDS および 0.24 M NaCl) で稀釈した。この RNA 溶液を 1.5 ml のオリゴー dT-カラムに通した。このカラムを 1 倍濃度結合緩衝液で洗浄した後、ポリ A 含有 RNA (mRNA) を NaCl を

含まない緩衝液によるカラム洗浄によつて溶出した。約100μgのポリA含有RNAを得た。このポリA含有RNAの一部をガラス管中で兔の網赤血球溶解物系〔Pel-ham, H.R.BおよびJackson, R.J., 欧州生物化学雑誌, 67, 247-256(1976)〕中ににおいて翻訳して牛の成長ホルモンを指定するmRNAの単離を確認した。

2. 二重に捺られたコピーDNA(cDNA)の製造
ポリA含有RNAから、それを50mMのトリス-HCl, pH 8.3; 100mMのKCl; 8mMのMgCl₂; 0.4mMのデオオスレイトール; 各5mMのdATP, dGTPおよびdTTP; および100単位の逆転写酵素および1.3μCi/mmolのオリゴ(-dT)_{12-18'}とから成る液の中で42°Cで1時間保温することによつて、約2.5μgのcDNAが合成された。この反応混合物を100°Cで3.5分間加熱し、次にそれを約3分間氷で急冷し、次に沈殿した蛋白を遠心分離して除いた後、その上澄み液にHEPES-NaOH, pH 6.9を100mM

まで; MgCl₂を5mMまで; デオオスレイトールを0.5mMまで; およびデオキシヌクレオシド三磷酸エスチルを0.125mMまでそれぞれ加えた。この液と300単位の大腸菌DNAポリメラーゼIとの混合物を15°Cで2.5時間培養すると1.8μgの二重に捺られたcDNAを生成した。このDNAをエタノールで抽出し、次にSephadex G-100上のクロマトグラフィー(13.5mlのカラム, 0.7cm×3.5cmを使用, 20mMのNaClで溶出)でこの生成物にとりこまれていない三磷酸エスチルから生成物DNAを分離し、次に1/10容の2Mの醋酸ソーダ, pH 5と2.5容の冷エタノールとを生成物溶液に添加して-20°Cの温度にして一晩かけてこのDNAのエタノール沈殿を行つた。この2重に捺られたcDNAは次に緩衝液(0.3MのNaCl, 30mMの醋酸ソーダ, pH 4.6および3mMのZnSO₄とから成る)の中で37°Cで8000単位のS1ヌクリアーゼを用いて1時間処理された。この反応はEDTAを10mMまでさらにトリス-HCl, pH 8.3を200mM

まで添加して停止され、その混合物は平衡させられたビオグルA-150mカラム(0.75cm×4.0cm)に通して吸着させ、次にそれを10mMのトリス-HCl, pH 7.5と250mMのNaClと1mMのEDTAとで溶離した。高分子量のDNAの複数のピークフラクション(各0.5ml)はプールされて、それに1/10容の2Mの醋酸ソーダ, pH 5と2.5倍容の冷100%エタノールの添加によりDNAのエタノール沈殿が行われた。

3. EcoRI リンカーの添加

S1処理した二重に捺られたcDNA(0.21μg)を緩衝液(60mMのトリス-HCl, pH 7.5; 8mMのMgCl₂; 5mMのデオオスレイトール; 1mMのATPおよび5mMの各デオキシヌクレオシド三磷酸塩)の中で9単位の大腸菌DNAポリメラーゼとともに10°Cで10分間培養し、その後氷上で冷却した。この「鈍い端末を有する」(blunt-ligated)二重に捺られたcDNAは次に、6.5mMのトリス-HCl, pH 7.5; 6mMのMgCl₂; 5mMのデオオスレイトール; 1mMの

ATPの中で、160pモルの³²P-置換識別されたEcoRI合成リンカー(cDNA端末より100x過剰)および4「鈍い端末」単位のT₄DNAリガーゼとともに15°Cで5時間培養され、次に氷上で冷却され、次に100mMのトリス-HCl, pH 7.5, 50mMのNaClおよび5.6mMのMgCl₂との中でEcoRI限定内ヌクレアーゼ(ニューイングランドビオラボ、9単位)を用いて37°Cで4時間45分処理され、次にエタノール抽出された。この抽出物はビオグルA-150mカラム(0.7cm×3.1.5cm)上で分離された。高分子量のDNAを含む複数の溶分(各0.5ml)はプールされ、次にエタノール沈殿が行われた。

EcoRI凝集未端を有するこの二重に捺られたcDNAは、EcoRI限定内ヌクレアーゼで切り開かれていた流動性のフージCGF4の二重に捺られたDNAに結合され、次にそれはH.goodmanおよびR.J.McDonaldの方法〔goodman, H.M.およびMacDonald, R.J.、酵素学の方法, 68, 75-91(1979)〕によつて子牛の腸のアルカリ性崩

特開昭60- 58077(18)

酵素を用いて処理されて末端の磷酸エステルが除かれた。その結紮反応は 6.0 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 6 mM の MgCl₂; 7 mM のチオセレイトール; 0.12 μg の二重に摂られた cDNA; 1.2 μg の CGF₄ DNA; 0.5 mM の ATP および 450 種類の T₄ DNA リガーゼが含まれた。結紮反応は 15 °C で 19 時間であつた。

4. 組換え CGF₄ DNA による大腸菌 DB4548 のトランスフェクション

大腸菌株 CGE6 (DB4548; *hsdR*⁻, *hsdM*⁺, *supE*, *supF*, *B*₆⁻, *met*⁻) を 1.50 mL の tryptone 肉汁中で 37 °C で振動しながら成長させ、OD₇₂₀ = 0.5 で 4 °C の温度での 10 分間の 7000 rpm の遠心分離でそれを収穫した。その細胞は 7.0 mL の氷冷 5.0 mM の CaCl₂ 中に再分散して、0 °C で 30 分間静置した。この懸濁液は次に 4 °C で 10 分間 7000 rpm で遠心分離して、さらに分離した細胞を 3 mL の氷冷 5.0 mM の CaCl₂ 中に再分散した。0 °C で 2 時間そのまま放置された後、細胞はトランスフェクションに使用された。5.0

mM のトリス-HCl, pH 7.5 中の結紮反応液の 1:40 稀釀液の 1 μL か 2 μL のいずれかを、5.0 mL の滅菌した 5.0 mM トリス-HCl, pH 7.5 を入れた 12 本のチューブのおのおのの中に入れた。あの CaCl₂ 处理した細胞の 1/10 mL を上のおのおののチューブに加え、その混合物は 30 分間氷上に置かれた。次にそれを 2 分間 37 °C に加熱後、終夜培養された CGE5 (JM101: J, Messing (1979), V (lac pro) *SupE thi*⁻ パックグランド中の *F' traD36 proAB lac IZVM15*) の 0.2 mL と 0.7 mL のソフト寒天培地の 3 mL とがそれに加えられた。次にその混合物は tryptone 寒天培地板の中に注がれた。それを終夜 37 °C で培養したところ 3000 以上のプラクを生じた。

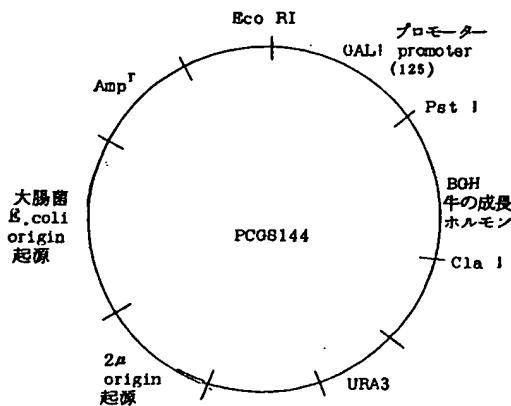
5. 牛の成長ホルモン記号系列を保持する組換え CGF₄ の同定

プラクはニトロセルローズに移され、Benton および Davis により (Benton, W.D. および Davis, R.W. *Science* 196, 180-182

(1977)]述べられたとおりに ³²P- 置換識別された牛の成長ホルモン cDNA を用いて探られた。cDNA プローブに強く雄性繁殖するフアージを板よりつまみあげ、TY 培地中で貯えた。健全なフアージのサンプルは CGE5 細胞上で終夜成長させて増強され、遠心分離によって収穫し、次にそれは、0.37 M のトリスグリシン、pH 9.5 を含みさらに 0.2 N NaOH 中で 1 時間処理し、0.5 M のトリス-HCl、pH 7.4 中で中和したとのエシジューム臭化物で着色した 0.6 μL のアガローズゲル中で電気泳動にかけられた。泳動はフアージ DNA の大きさのロットに逆比例し、それは、600~1200 の基本対の大きさをもつ牛の成長ホルモン DNA 插入物を保持する約 45 種類のフアージの選別を可能にした。一重に摂られた DNA が細内らの方法 (細内, K., Vovis, G.F. および Zinder, N.D., *生物化学雑誌*, 249, 543-552 (1974)) により作られ、混成物の選別が行われた。溶離された RNA は網赤血球溶解物系中で Pelham および Jackson の方法 (Pelham,

H.R.D. および Jackson, R.J., *欧洲生物化学雑誌*, 67, 247-256) によって翻訳され、そのたん白質生成物の分析により真正の免疫沈降性牛成長ホルモンの生成が明らかにされた。2 重に摂られた RFIDNA がそのフアージから Moses らの方法 (Moses, P.B., Bocke, J.D., 細内, K. および Zinder, N.D., *Virology*, 104, 267-273 (1980)) により作られた。各 DNA を EcoRI および *Pst*I 限定内ヌクレアーゼを用いて切断し、得られた破片をアガローズゲル上で分析してその挿入物は *Pst*I 部位を含むことを確認した。約 350 基本対のセグメントを有するある一つ (bp) のフアージ DNA を選択してそれを更に検討した。DNA 插入物が表 6 に示すように Maxam および Gilbert の方法 (Maxam, A.M. および Gilbert, W., *酵素学の方法*, 68, 499-560 (1980)) によって順序どおりに並べられた。

表 5



衆 6

6. サツカロミケスセレヴィジエ中の牛の成長ホルモンの表示

表5に見られるとおり酵母中の牛の成長ホルモンの表示をつかむのを容易にするよう考案された遺伝子断体 CGS144 が組立てられた。酵母中に牛の成長ホルモンを生成するため、ATG開始コードンが最初のアミノ酸(フェニールアラニン)の5'-側にとりこまれた。Hae IIは最初のコードンの3'-側で切断するという事実にもとづいて、Pheコードンの5'-端を開くためHae II消化が行われた。6.6 mMのトリス-HC_l, pH 7.5; 6.6 mMのNaC_l; 6.6 mMのMgC_l₂および6.6 mMのデチオスレイトールの中で0.5 mMのdATPの存在の下でDNAを4単位大腸菌DNAポリメラーゼI (Klenow断片)を使用して室温で30分間処理してその継続端を摘んで整えた。それからS8ヌクレアーゼを用いて鈍い端末を有するようにした。

ATG開始コードンを含有するC₆a I合成リンカ (CATGGATG) が、6.6 mMのトリス-

HC_l, pH 7.5; 1.0 mMのMgC_l₂; 1.0 mMの2-メルカプトエタノール; 500 pモル³²P-C₆a Iリンカーとともに1 mMのATP; 4 pモルのDNA (20 μ g)および4鈍い端末単位のT₄DNAリガーゼを含む液の中で17°Cで終夜、その鈍い端末の断片に結縛された。この結縛はATG開始コードンを作り出し最初のコードンTGTを復活させた。C₆a Iポリリンカーは、1.0 mMのトリス-HC_l, pH 7.5; 1.0 mMのMgC_l₂および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μ lの反応液中で37°Cで20単位の限定内ヌクレアーゼC₆a Iを用いてこの断片を3時間処理して、とり除かれた。得られた断片は遺伝子断体(プラズミド)pBR322のC₆a I部位にクローンされた。このプラズミド(遺伝子断体)(1.0 μ g)は、1.0 mMのトリス-HC_l, pH 7.5; 1.0 mMのMgC_l₂および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μ lの反応液中で限定内ヌクレアーゼC₆a I(ニューアイジングランドビオラボ, 20単位)を用いて37°C 2時間で

切断された。限定切断プラズミドの調剤はフェノール抽出され次にエタノール沈殿され、次にそれはH. GoodmanおよびR.J. MacDonaldの方法 [Goodman, H.M. および MacDonald, R.J., 球菌学の方法, 68, 79-91 (1979)]により小牛の腸の磷酸酵素で処理されて末端の磷酸エステルが除かれた。約0.5 pモルのC₆a I処理断片と0.3 pモルのC₆a I切断プラズミドとは、6.6 mMのトリス-HC_l, pH 7.5; 6 mMのMgC_l₂; 1.0 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATPおよびT₄DNAリガーゼ(ニューアイジングランドビオラボ, 300単位)を含有する20 μ lの反応液中で15°Cで3時間互に結縛されてプラズミドpCGE27を作りだした。

形質転換の能力のある大腸菌株CGE43(LG90; F' V(lac-pro X))が、CGE6に對して前に述べたとおりにして作られた。5 μ lの結縛されたDNAが200 μ lのその細胞を0°Cで30分間混合され、次に37°Cで2分間熱処理され、次に室温で10分間培養されてから新鮮なトリプト

ン肉汁で5倍に稀釈された。37°Cで振動しながら30分間培養後、細胞はアンピシリン(20 μ g/ml)を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが選び出されてプラズミドDNAが製造されて限定酵素消化によつて分析された。これらの判定規準によつて数個の細胞は希望のプラズミドpCGE27を保持していた。1.0 mMのトリス-HC_l, pH 7.5; 1.0 mMのMgC_l₂; 6.0 mMのNaC_l; および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μ lの反応液の中で、プラズミドpCGE27 DNA (1.0 μ g)が限定内ヌクレアーゼHind III(コラボラチブ研究会社、12単位)を使用して37°Cで2時間切断された。このDNAは次に、1.00 mMのトリス-HC_l, pH 7.6; 1.0 mMのMgC_l₂; 5.0 mMのNaC_l; および1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する反応液中で、内ヌクレアーゼEco RI(コラボラチブ研究会社、1.5単位)を用いて37°Cで3時間消化された。この限定切断DNAは、前述のように0.5 mMの

dTTPの存在下に大腸菌DNAポリメラーゼI (Klenow断片)を用いて端末を摘んで療えられさらに S₁ ネクレアーゼを用いて鈍い端末を有するものにされた。このDNAは次にフェノール抽出され次にエタノール沈殿され、次にそれは水に再溶解されてから予備の水平の1.5%アガローズゲルに加えられた。そのゲルは、4.0 mMのトリスアセテート、pH 7.2中で2-3時間電気泳動後、エシジューム臭化物で着色して長波長紫外光線を使って検査された。この消化されたDNAはゲルピースを凍結してから解かすこと〔Thuringら、分析生化学、66, 213(1975)〕によつて抽出された。このDNA断片はエタノール沈殿され次に水に再溶解された。pBR322のEcoRI/PvuII部位に挿入されたP_{lac}の95基本対を含有するプラズミド(pGL101; 20 μg)が限定内ネクレアーゼPvuII(ニューイングランドビオラボ、24単位)を使用して37℃で6分間切断された。この限定切断DNAはフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解さ

れた。このPvuIIで開かれたベクトル(保菌生物)はゲル電気泳動により分析され、ゲル(上を見よ)から切り取られた。牛の成長ホルモンを指定する前述のDNA断片の約0.25 pモルが、6.6 mMのトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mMのMgCl₂; 1.0 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATPおよびT4DNAリガーゼ(ニューイングランドビオラボ、300単位)を含有する20 μlの反応液中で14℃で4時間PvuII部位で開けられたプラズミドPGL101(上を見よ)中に結縛された。形質転換の能力のある大腸菌株CGE43細胞が上述と全く同様にして調製された。あの結縛されたDNAの5 μlがこの細胞の100 μgと0℃で30分間混合され、次に37℃で2.5分間熱処理され、次に新鮮なトリプトン肉汁で10倍に稀釀された。この細胞は振動しながら37℃で30分間培養後、アンピシリン(20 μg/ml)を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが選び出されてプラズミドDNAが作られ、次にその正しい定位が限

定酵素消化によつて分析された。これらの判定基準によつて数個の株は希望されたプラズミドpCGE22を保持していた。このプラズミドはP_{LAC}-Phe-牛成長ホルモン遺伝子を含有した。プラズミドpCGE22を上のとおり限定内ネクレアーゼPvuIIおよびPstIを用いて37℃で部分切断することによつて、このプラズミド(30 μg)から牛の成長ホルモン用遺伝子含有の断片を単離した。この限定切断DNAはフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解されてから予備の0.5%アガローズゲルに加えられた。そのゲルは、4.0 mMのトリスアセート、pH 7.2中で電気泳動後、それはエシジューム臭化物で着色し、次に長波長紫外光線下で試験した。バンドが切り取られそのDNAは、ゲルピースを凍結してから解かすこと〔Thuringら、分析生化学、66, 213(1975)〕によつて、抽出された。このDNA断片はエタノール沈殿され次に水に再溶解された。このPvuII/PstI断片の約0.5 pモルが、P_{LAC}/Z'領域に接続した

EcoRI部位およびPstI部位で開かれたプラズミドpCGE41中に結縛された。EcoRI部位は大腸菌DNAポリメラーゼIで充填されていた。結縛反応は、6.6 mMのトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mMのMgCl₂; 1.0 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATPおよびT4DNAリガーゼ(コラボラティブ研究会社、10単位)を含有する20 μlの反応液中で14℃で2.5時間行われた。この結縛されたDNAは、望まれたプラズミドのpCGE51を含有することが認められた要求にかなう大腸菌細胞の形質転換するために使用された。プラズミドpCGE27がClaI限定酵素を用いて切断され、得られた断片はS₁ネクレアーゼを用いて鈍い端末を有するものにされた。S₁合成リンカーゴー(GGTGAGCC)がこの鈍い端末を有する断片に結縛された。20単位の限定内ネクレアーゼSafIによる処理によつてSafIボリリンカーゴーがとり除かれた。それは次にPstIを用いて切断された。得られた断片はpCGE51のPstI/XbaI牛成長ホルモン'Z断片とともに前述した

ように酵母の連続往復式ベクトル(保菌生物)
pCGS40の中にクロンを発生させられた。

プラズミドpCGS40は、大腸菌中の選別のためのDNA応答基質およびβ-ラクトマーゼ遺伝子とを含有するpBR322の大部分を含んでおり、一方酵母2μmプラズミドの1.6キロベース断片は酵母中の応答の開始部位を含んでおり、酵母の染色体のDNAからの1.1キロベース断片は酵母の選別のためのURA3遺伝子を保持しており、さらに酵母の染色体のDNAからの0.9キロベース断片は酵母転化酵素遺伝子のSUC2プロモーターを含んでいる。このプラズミドpCGS40は6.0μgのプラズミドpRB118を最初に切断すること[Carlson, M. および Botstein, D., 細胞, 28, 145-154(1982)]によって作られた。そしてその切断は限定内ヌクレアーゼHindIIIを用いて37℃で30分間行われ次に限定内ヌクレアーゼEcoRI(上を見よ)を用いてさらに行われた。この限定切断DNAはエタノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解してからダ

ル電気泳動を行つて精製された。SUC2遺伝子のプロモーターを含有するこの消化されたEcoRI対HindIII 0.9キロベースバンドは切り取られ、そのDNAはガラスピードによつて抽出された。[Vogelstein, B. およびGillenpie, D., PNAS, 76, 615-619(1979).]

SUC2プロモーターを含有するこの0.9キロベースDNA断片は、プラズミドYIP5(URA3遺伝子の存在によつて酵母用に選択されてその中に保持されあるいはAmp遺伝子の存在によつて大腸菌用に選択されてその中に保持されることができる連続往復式ベクトル)の上に載せられた。結晶および形質転換後に得られた生成プラズミドpCGS46は精製され、その構造が確認された。プラズミドpCGS40は限定内ヌクレアーゼPvuIIを用いてプラズミドpCGS46を37℃で1時間切断して組み立てられた。プラズミドYEP13(これはスタンフォード大学のR. Davis氏から入手したものであるが)からの2μmDNAの1.56キロベース断片が、HpaIとHindIIIを用いて

YEP13を切断してとり出された。この得られた断片はゲル精製され、エタノール抽出され、さらにエタノール沈殿され、次にHindIII限定切断が行われた切目に鈍い端末を作り出すためにT4DNAポリメラーゼ(上を見よ)を用いて処理された。エタノール抽出とエタノール沈殿後のPvuII切断DNAと鈍い端末を有する2μmDNA断片とはゲル電気泳動によつて精製され、次に終夜お互に結晶された。かくて得られたプラズミドpCGS40は成長させることができ、大腸菌中またはサクカロミケスセレヴィジエ(cerevisiae)中におけるその存在は選別されることができる。形質転換と制限分析のあと、牛の成長ホルモン¹²⁵Iを含有する要望されたプラズミドpCGS75が得られた。

このプラズミドpCGS75はSalIを用いて切断され、次に大腸菌DNAポリメラーゼIによる処理によつて鈍い端末を有するものにされた。この鈍い端末を有するDNAはそれからXbaIを用いて切断され、その断片はゲル精製された。この同一プラズミドはまたEcoRI/XbaIを用いて

切断されて断片を生じた。そしてその断片は、前に単離されたSalI-鈍い端末の/XbaI断片やpBM125のEcoRI/BamHI断片との結晶で直ちに酵母の連続往復式ベクトル上に、P_{GAL1}牛成長ホルモン¹²⁵Iを含有するpCGS118を生じた。P_{GAL1}プロモーター(820bp)はpBM125(スタンフォード大学のR. Davis氏の好意)から作つた。pBM125はBamHIで切断され、次に大腸菌DNAポリメラーゼIを充填され、次にEcoRIを用いて切断された。

P_{GAL1}によつて機能を促進される牛の成長ホルモン遺伝子を含有するpCGS144の組み立ては三分子反応によつて成達げられた。GAL1プロモーターと牛の成長ホルモン遺伝子の一部とはpCGS118からXbaIおよびPstIによる限定切断によりとり出された。牛の成長ホルモンの残りはPstIおよびCbaIを用いてのpCGE27の切断によつて得た。これらのゲル精製された断片は2μmの一部とURA3遺伝子とを含有するpCGS57のXbaI/CbaI断片と結晶された。

酵母株 CGY150 (MAT_a, leu2-3, leu2-112, ura3-50) は、A. Hinnen, J. B. Hicks および G. Fink の方法 [Hinnen, A., Hicks, J. B. および Fink, G. F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978)] によって牛の成長ホルモンプラズミド DNA を用いて形質転換された。酵母の形質転換された菌 CGY196 が採取されたが、これはプラズミド上に URA3 遺伝子が存在するためウラシルを添加しなくとも成長が可能である。(プラズミド pCGS144 を保持する株 CGY196 は米国類型培養コレクション (ATCC) に預けられている。受け入れ番号 20643. 1982年9月預け入れ。)

この酵母の細胞を、6.7 g / l 酵母窒素ベース、3.0 g / l の L-ロイシンおよび 2% のガラクトースを含有する培地中で搅拌下 30°C で成長させた。牛の成長ホルモンの合成はガラクトースの存在によってひきおこされた。搅拌下 30°C でクレット (Klett) = 50 まで成長後、その細胞は遠心分離で集められ、0.05 M のトリス-HCl, pH

EDTA を含む 5.8 M の CsCl, pH 7.2 の 3 ml の薄層の上に流した。その混合液を、ベックマンタイプの 50 Ti ローターの中で 40,000 rpm で一晩中 15°C で遠心分離した。このペレットは上の冷緩衝液に 20 mM の EDTA をプラスしたもの 6.6 ml 中で氷冷したが 20 分間再分散された。次にそれは氷冷 100% エタノールの 3.3 ml で処理された。それを -20°C に冷却して 1 時間置いたのち、その沈殿物は、-10°C で 20 分間 8000 rpm で遠心分離して小粒状にされた。このペレットは 1.8 ml の前の緩衝液中に 2 回再分散された。その分散液は氷冷 100% エタノールの 9 ml で処理され、次に -20°C に 1 時間冷却され、次にそのペレットは上述したようにして集められた。その最終のペレットは 60°C に加熱された 8 ml の 0.1 M の EDTA の中に再分散され、次に 0.1% の 2 M 酢酸ソーダ、pH 5.0 と 2 倍容の氷冷 10.0% エタノールとが加えられ、次にその溶液は -20°C で一晩おかれた。RNA 沈殿物が、-10°C で 8000 rpm の遠心分離を 20 分間行うことによつ

特開昭60- 58077 (23)

7.6, 20% グリセリンおよび 1 mM の PMSF から成る 0.25 ml 中に再分散され、次に -20°C で凍結された。R. Rose らの方法 [Rose, M., Casadaban, M. J. および Botstein, D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 2460-2464 (1981)] によってガラスのビードでその細胞は分裂させられた。細胞の抽出物中の牛の成長ホルモンの活性度の量は免疫沈殿により測定された。

製造された牛の成長ホルモン遺伝子を順序どおりに並べる情報は表 6 に示す。

例 2.

インターフェロンの製造

1. 1 FN mRNA の単離

3.55 g のせんたいウイルスに誘導されたりんば球がドウンスホモゲナイザーで、5.0 mM の醋酸ソーダ、pH 5.2; 6 M のグアニジン HCl; および 0.1 M の 2-メルカプトエタノールから成る冷緩衝液 (10°C) の中に分裂させられた。得られた溶液は 60 W のパルスされた電力で 2 × 30 秒の間超音波処理され、次にそれは、0.1 M の

て集められた。それは 5 ml の水に溶かされた。収量は 3.96 mg の RNA であった。この RNA 水溶液は 2 × 濃厚結合緩衝液 (20 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 2 mM の EDTA; 0.4% の SDS; および 0.24 M の NaCl) の 5 ml で稀釈された。この RNA は 1 ml のオリゴー dT-セルローズカラムに通して吸着させた。次にカラムは 1 × 濃厚結合緩衝液で洗浄したのち、ポリ A-含有 RNA (mRNA) は、NaCl を含有しない結合緩衝液でカラムを洗浄して溶離された。約 3.9 mg のポリ A-含有 RNA が得られた。ポリ A-含有 RNA の一部が、ガラス管中で兔の網赤球溶解物系 [Pelham, H. R. B. および Jackson, R. J., 欧洲生物化学雜誌 67, 247-256 (1976)] の中に翻訳されてインターフェロンを指定する mRNA の単離が確認された。

2. 二重に摂られたコピー DNA (cDNA) の製造

2.5 μg のりんば球ポリ A-含有 RNA から、それを 50 mM のトリス-HCl, pH 8.3; 100 mM の KCl; 8 mM の MgCl₂; 0.4 mM の

デチオスレイトール；各 1.2 mM の dATP, dGTP および dTTP；および 100 単位の逆転写酵素および 0.25 mM の α -³²P-dCTP (1.8 Ci/mmol) を含有する 20 μ g/ml のオリゴ(-dT)₁₂₋₁₈’ とから成る液中で 42°C で 1 時間培養することによつて、約 2.5 μ g の cDNA を合成した。この反応混合物を 100°C で 3.5 分間加熱し、次に氷上で約 3 分間それを急冷し、次に沈殿したたん白質を遠心分離して除いた後、上澄み液に Hepes-NaOH, pH 6.9 を 100 mM まで；MgCl₂ を 5 mM まで；デチオスレイトールを 0.5 mM まで；およびデオキシヌクレオシドの三磷酸エステルを上述のとおりそれぞれ加えた。この混合物を 300 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I と共に 1.5°C で 2.5 時間培養した結果 1.8 μ g の二重に摂られた cDNA を生成した。この DNA は フエノール抽出され、次にその DNA は、とりこまれていない三磷酸エステルから、Sephadex G-100 上のクロマトグラフィー (13 ml カラム, 0.68 cm × 37 cm, 20 mM のトリス-HCl, 6

pH 7.5 と 3.5 mM の EDTA とで溶離) によつて分離された。次にそれは、1/10容の 2 M の醋酸ソーダ；pH 5, と 2.5 倍容の冷エタノールとを添加して -20°C に冷却して一晩放置してエタノール沈殿を行つた。この二重に摂られた cDNA は次に、緩衝液 (0.3 M の NaCl, 30 mM の醋酸ソーダ；pH 4.6、および 3 mM の ZnSO₄) 中で 8000 単位の S₁ ネクレアーゼを用いて 37°C で処理された。この反応は、EDTA を 10 mM までおよびトリス-HCl, pH 8.3 を 200 mM まで添加して停止させられた。次にこの混合物は平衡されたビオグル A-150 ml カラム (0.7 cm × 3.5 cm) に通して吸着させ、次にそれは 10 mM のトリス-HCl, pH 7.5, 250 mM の NaCl および 1 mM EDTA からなる液を用いて溶離した。高分子量の DNA の複数のフラクション (各 0.5 ml) はプールされ、それは次に 1/10容の 2 M の醋酸ソーダ；pH 5, および 2.5 倍容の冷 100% のエタノールを加えてエタノール沈殿を行つた。

3. Hind III リンカーの添加

S₁ 処理された二重に摂られた cDNA (0.21 μ g) は、緩衝液 (60 mM のトリス-HCl, pH 7.5；8 mM の MgCl₂；5 mM のデチオスレイトール；1 mM の ATP および 1 mM の各デオキシヌクレオシド) の中で 9 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I とともに 10°C で 10 分間培養され、次にそれは氷上で冷却された。この純い端末を有する二重に摂られた cDNA は次に、65 mM のトリス-HCl, pH 7.5；MgCl₂；5 mM のデチオスレイトール；および 1 mM の ATP から成る液中で 160 p モルの ³²P-置換識別された合成リンカ - (cDNA 端より 100 × 過剰) および 4 純い端末単位の T₄ DNA リガーゼと共に 1.5°C で 5 分間培養され、次に氷上で冷却され、次に熱処理してリガーゼを不活性化し、次に 5.6 mM のトリス-HCl, pH 7.5, および 5.6 mM の MgCl₂ より成る液中で Hind III 限定内ヌクレアーゼ (ニューアングランドビオラボ、9 単位) を使用して 37°C で 4 時間 45 分間処理し、次にそれをフエノール抽出した。この抽出液はビオグル A-150 ml カ

ラム (0.7 cm × 3.1.5 cm) 上で分別された。高分子量の DNA を含有する複数のフラクション (各 0.5 ml) はプールされてエタノール沈殿された。

Hind III 検出末端を有するこの二重に摂られた cDNA は、Hind III 限定内ヌクレアーゼを用いて切り開かれていた流動性フアージ CGF4 の二重に摂られた DNA に結合され、次にそれは H. Goodman および R. J. MacDonald の方法 [Goodman, H. M. および MacDonald, R. J., 酶素学の方法, 68, 75-91 (1979)] によつて小牛の腸のアルカリ性磷酸酵素を用いて処理されて末端の磷酸エステルが除かれた。(註: フアージ CGF4 を作るためには、流動性フアージ R229 [Bocke, J. D., Mol. Gen. Genet. 181, 288-291 (1981)] が Eco RI を用いて切断され、次に T₄ DNA ポリメラーゼを用いて純い端末を有するものにされ、次にコラボラチで研究会社 (マサチューセッツ州レキシントン) からの Hind III 合成オリゴヌクレオチドリンカーと結合された。) その結合反応には 60 mM のトリス-HCl, pH 7.5；6 mM の

$MgCl_2$; 7 mM のデチオスレイトール ; 0.12 μg の二重に摺られた cDNA ; 1.2 μg の CGF4 DNA ; 0.5 mM の ATP および 450 級集端単位の T4 DNA リガーゼが含まれた。結紮反応は 15 °C で 19 時間であった。

4. 組換え CGF4 DNA による大腸菌 DB4548 のトランスクレクション

大腸菌株 CGE6 (DB4548; $hsdR^-$, $hsdM^+$, $supE$, $supF$, Bf^- , met^-) が 150 μl のトリプトン肉汁の中で振動しながら 37 °C で生長させられ、 $OD_{700} = 0.5$ で 4 °C 10 分間の 7000 rpm 速心分離によって収穫された。その細胞は 70 μl の氷冷 50 mM の $CaCl_2$ 中に再分散され、0 °C で 30 分間静置された。この懸濁液はそれから 4 °C で 7000 rpm で 10 分間速心分離され、次に 3 ml の氷冷 50 mM の $CaCl_2$ 中に再び分散された。0 °C で 2 時間放置後、その細胞はトランスクレクションに用いられた。

5.0 mM のトリス-HCl, pH 7.5 中の結紮反応液の 1 : 40 稀釀液の 1 μl か 2 μl が、50

μl の無菌 50 mM のトリス-HCl, pH 7.5 を入れてある 12 本のチューブのおのにおのに加えられた。あの $CaCl_2$ 处理した細胞懸濁液の $1/10 ml$ を上ののおののチューブに加え、その混合物は 30 分間氷上で冷却された。その混合物を 37 °C で 2 分間加温したのち、終夜培養された CGE5 (JM101; J. Messing (1979), Δ (lac prs) $SupE$ thi^- バックグラウンド中の P' trad 36 $proAB$ $lacIZ\Delta M15$) の 0.2 ml と 0.7 % の柔軟寒天培地の 3 ml とがその混合物に加えられ、次にその混合物はトリプトン寒天培地プレートに注がれた。37 °C で一晩培養したところ 1280 以上のプラクを生じた。

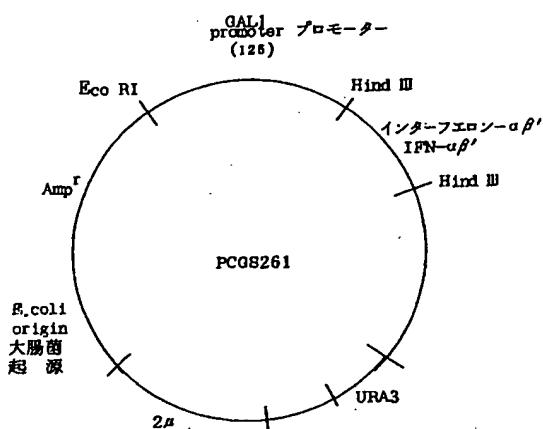
5. 白血球インターフェロン記号系列を保持する組換え CGF4 の同定

プラクはニトロセルローズに移され、Benton および Davis が述べたようにして [Benton, W. D. および Davis, R. W., 科学 196, 180-182 (1977)], LeIFN の既知のセグメントに対応する ^{32}P -置換識別された合成オリゴヌクレ

オチド (CATGATTCTGCTCTGAC の記号系列を有する。コラボラティブ研究会社製。) を使用してそれは探索された。6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.5 と 1.0 mM の $MgCl_2$ を含有する 20 μl の反応液中で 6 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (P-L ピオケミカル) を使用してオリゴヌクレオチド (1 μg) に 0.5 mM γ - ^{32}P -ATP を転移させた。この合成オリゴヌクレオチドプローブに強く離離したフアージが板から採取されて 4 °C で T Y 培地で貯えられた。健全なフアージのサンプルが CGE5 細胞上で一晩成長させて増強されて速心分離で収穫され、次に 0.37 M のトリス-グリシン、pH 9.5 を含む 0.6 M のアガローズゲル中で電気泳動にかけられ、次に 0.2 N NaOH で 1 時間処理しさらに 0.5 M のトリス-HCl, pH 7.4 中で中和したのちエシジューム塗化物で着色された。移動はフアージ DNA の大きさの \log に逆比例するので、それにより 1000~1200 基本対の大きさをもつ挿入された IFNDNA を保持するフアージの選別が可能となつた。この

フアージから、Mosesらの方法 [Moses, P. B., Boekel, J. D., 堀内, K. および Zinder, N. D., Virology 104, 267-273 (1980)] により二重に摺られた RFIDNA が作られた。この DNA が Hind III 限定内ヌクレアーゼを用いて切断され、得られた断片をアガローズゲル上で分析して挿入物は Hind III の部位にあつて予想された大きさであつたことを確認した。フアージ DNA の中の 1 つで約 1200 基本対 (bp) の挿入物を有するものが選択されて更に検討された。この DNA 挿入物は Maxam および Gilbert の方法 [Maxam, A. M. および Gilbert, W., 酵素学の方法 68, 499-560 (1980)] によって順序どおりに並べられた。

表 7



6. サツカロミケスセレビジエ中の L_e インターフェロンの表示

表7に見られるとおり酵母中の L_e インターフェロンの表示をつかむのを容易にするよう考案されたプラズミド pCGS261が組立てられた。酵母

中に L_e インターフェロンを生成するため、ATG開始コードンが成熟した加工されたインターフェロン(IFN)の最初のコードン(システィン用のTGT)の5'-側面にとり込まれた。Sau3Aはこの最初のコードンの3'-側面で切断するという事実にもとづいて、コラボラチエ研究会社によつて、ClaIによって認識されかつATG-TGT系列を含有するオリゴヌクレオチド(ACACATCGATG-TGT)が合成された。アミノ酸残基の2から61までをコード化するSau3A断片は、1.0 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 1.0 mMのMgCl₂; および6.0 mMのNaClを含む5.0 μlの反応液の中で1.0単位のSau3A限定内ヌクレアーゼを使用してHindIII 1.2キロベース断片の3.0 μgを37°Cで4時間消化することによつて、精製された。そのDNA断片はポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて精製された。このDNAはエノール抽出され、次に氷冷100%エタノールで沈殿させられた。6.6 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 6.6 mMのNaCl; 6.6 mMのMgCl₂およ

び6.6 mMのデチオスレイトールを含む液中で4単位の大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenow断片)と0.1 mMの各ヌクレオシド三磷酸エステルとを用いてそのDNAを室温で30分間処理することによつてその凝集端はふさがれた。

6.6 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 1.0 mMのMgCl₂; 1.0 mMの2-メルカプトエタノール; 5.00 pモルの³²P-オリゴヌクレオチド(5 μg)と共に1 mMのATP; 4 pモルのDNA(2.0 μg)および4銑い端末単位のT4DNAリガーゼを含む液中で、上記の合成オリゴヌクレオチドが Sau3A断片に17°Cで一晩中結縛された。この結縛反応はATG開始コードンを新しく作り、最初のコードンTGTを復活した。1.0 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 1.0 mMのMgCl₂; および1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含む2.0 μlの反応液中で2.0単位の限定内ヌクレアーゼClaIを用いてこの断片を37°Cで3時間処理することによつてClaIポリリンカーチは除かれた。この得られた断片はプラズミド pBR322 のClaI部位

にクローンされた。このプラズミド(1.0 μg)は、1.0 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 1.0 mMのMgCl₂; および1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含む2.0 μlの反応液中で限定内ヌクレアーゼClaI(ニューアイグランドビオラボ、2.0単位)を用いて37°Cで2時間切断された。限定切断されたプラズミドのこの製剤はエノール抽出され、次にエタノール沈殿させられ、次にそれはH. GoodmanおよびR.J. MacDonaldの方法(Goodman, H.M. および MacDonald, R.J., 酶素学の方法 68, 75-91(1979))によつて牛の腸の構成酵素を用いて処理されて末端の構成エステルがとり除かれた。上述のClaI処理断片の約0.5 pモルとこのClaI切断プラズミドの約0.3 pモルとが6.6 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 6.6 mMのMgCl₂; 1.0 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATP; およびプラズミド pCGE32 を新しく作るT4DNAリガーゼ(ニューアイグランドビオラボ、300単位)を含有する2.0 μlの反応液中で15°Cで3時間お互に結縛された。

形質転換の能力のある大腸菌株 CGE43 (LG90; $F^- \Delta(lac-pro)_x$ III) が CGE6 に対して前に述べたとおりにして調製された。あの結紮された DNA の $5 \mu\text{g}$ がこの細胞の $200 \mu\text{g}$ と 0°C で 30 分間混合され、次に 37°C で 2 分間熱処理され、次に 18°C で 10 分間培養され、次に新鮮なトリプトン肉汁で 5 倍に稀釀された。振動しながら 37°C で 30 分間培養後、この細胞はアンピシリン ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが採取されてプラズミド DNA が調製され、次にそれは限定酵素消化により分析された。この判定基準により数個の細胞は要望されたプラズミド pCGE32 を保持した。

インターフエロン遺伝子の残りは、アミノ酸残基 37 を指定する領域に位置する EcoRI 部位を使用して元に戻された。プラズミド pCGE32 DNA ($10 \mu\text{g}$) は、 10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl_2 ; 60 mM の NaCl ; および $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の牛の血清アルブミンを含む 20

μl の反応液中で限定内ヌクレアーゼ Hind III (コラボラチブ研究会社、12 単位) を用いて 37°C で 2 時間切断された。この DNA は次に、 100 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 10 mM の MgCl_2 ; 30 mM の NaCl ; および $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の牛の血清アルブミンを含む $20 \mu\text{l}$ の反応液中で内ヌクレアーゼ Eco RI (コラボラチブ研究会社、15 単位) を用いて 37°C で 3 時間消化された。この限定切断 DNA はエタノール沈殿され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解されてから予備の水平の 1.5% アガローズゲルに加えられた。 40 mM のトリスアセテート、pH 7.2 中で 2~3 時間電気泳動後、そのゲルはエシジューム臭化物を用いて着色し、次にそれは長波長の紫外光線の下で試験された。アミノ酸残基 37 に ATG-TGT のコードを指定する消化された Hind III から Eco RI までのバンドは切り取られ、そしてこの DNA はゲルピースを凍結して次に解かすこと (Thuringら、分析生物化学 66, 213 (1975)) によって抽出された。この DNA 断片はエタノ

ル沈殿され、次に水に再溶解された。インターフエロンクローンを含有するこのプラズミド ($20 \mu\text{g}$) 上と同様に限定内ヌクレアーゼ Hind III (ニューアイングランドビオラボ、180 単位) を用いて 37°C で 2 時間切断され、次にこの DNA ($12 \mu\text{g}$) は限定ヌクレアーゼ Eco RI (ニューアイングランドビオラボ、24 単位) を用いて 37°C で 6 分間切断された。この限定切断 DNA はエタノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解された。この Eco RI から Hind III までの断片はインターフエロンの 3'-翻訳しない領域にアミノ酸残基 37 を指定するものであるが、その断片はゲル電気泳動により分析されてゲルから切り取られた (上を見よ)。

各断片の約 0.25 pM がともに、 6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mM の MgCl_2 ; 10 mM のチオスレイトール; 1 mM の ATP および T4DNA リガーゼ (ニューアイングランドビオラボ、300 単位) を含有する $20 \mu\text{l}$ の反応液中で、Hind III 部位 (上を見よ) で開かれたブ

ラズミド pBR322 に結紮された。

形質転換の能力のある大腸菌株 CGE43 細胞が正確に上述したとおりにして調製された。そしてこの結紮された DNA の $5 \mu\text{g}$ がこの細胞の $100 \mu\text{g}$ と 0°C で 30 分間混合され、次に 37°C で 2.5 分間熱処理され、次に新鮮なトリプトン肉汁で 10 倍に稀釀された。振動しながら 37°C で 30 分間培養後、細胞はアンピシリン ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含むトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが採取されてプラズミド DNA が調製され、それは限定酵素消化によって分析された。この判定基準により数個の株は要望されたプラズミド pCGE38 を保持した。

P_{GAL1} が Eco RI および Bam H β 部位の間に挿入された標準の連続往復式ベクトルである pCGS 109 の中に Hind III 部位が組立てられた。ベクトル pCGS 109 は Bam H β 限定酵素を用いて切断され、S β ヌクレアーゼを用いて消化されて凝集端を除いて鈍い端末を有するものにし、次に Hind III

リンクで結合された。このベクトルは Hind III 限定酵素を用いて処理され、次に凝集端が互に結合されてベクトル pCGS135 を生成した。プラズミド pCGE38 を限定内ヌクレアーゼ Hind III を用いて上と同様に 37°C で 1.5 時間切断することによつて、そのプラズミド (30 μg) から Le インターフエロンの遺伝子を含有する 1.1 キロベース Hind III 断片が単離された。この制限切断 DNA はエチノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解されて予備の 1 モアガローズゲルに加えられた。40 mM のトリスアセテート中で電気泳動後、このゲルはエシジューム臭化物で着色されて長波長紫外線の下で試験された。1.1 キロベースバンドが切り取られ、この DNA は、ゲルを凍結して次に解かす方法 [Thuring ら、分析生物化学 66, 213 (1975)] により抽出された。この DNA 断片はエタノール沈殿され、次に水に再溶解された。この Hind III 断片の約 0.2 μg が、P_{GAL1} 領域に隣接した Hind III 部位で開かれたプラズミド pCGS135 (1 μg)

に結合された。このベクトルとインターフエロン断片との結合は、6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mM の MgCl₂; 10 mM のデチオスレイトール; 1 mM の ATP および T4DNA リガーゼ (コラボラチブ研究会社、10 単位) を含む 20 μl の反応液中で 14°C で行われた。

このプラズミド DNA を使用して A. Hinnen, J. B. Hicks および G. Fink の方法 [Hinnen, A., Hicks, J. B. および Fink G. F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978)] により、酵母菌 CGY528 (ura3-52, his4-29, pep4-3, GAL+) が形質転換された。プラズミド上に URA3 が存在するためウラシルが添加されなくても成長が可能な酵母の形質転換品の CGY528 が採取された。(プラズミド pCGS261 を保持する株 CGY528 は米国類型培養コレクション (ATCC) に預けてある。受入れ番号 20663, 1983 年 2 月預け入れ。)

この酵母細胞は、6.7 g / l の酵母窒素ベースと 20 μg / l のヒスチジンと 2 % のガラクトース

とを含有する培地で振動しながら 30°C で成長させた。インターフエロンの合成はクレット = 50 (10⁷ 細胞 / ml) まで成長させたこの細胞を遠心分離して集めることによつて確認された。すなわち集めた細胞は 0.05 M のトリス-HCl, pH 7.6; 20 % のグリセリンおよび 1 mM の PMSF を含む 0.25 ml の液中に再分散させ、次に -20°C で凍結した。この細胞は、M. Rose らの方法 [Rose, M., Casadaban, M. J. および Botstein, D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 2460-2464 (1981)] によりガラスピードで分裂させられた。細胞の抽出物中のインターフエロン活性度の量は常法により定量され可溶たん白質 1 mg 当り 10⁵ 単位であった。

生成された人間の白血球のインターフエロン遺伝子を順序とおりに並べる情報を表 8 に示す。

实施例 3

プロレンニンの製造

1. R N A の単離

乳汁-飼養の子牛からの異組織を他方の畜肉から新しく入手した。即ち第4胃の粘液を胃壁から切開して取出し、ドライアイス中で冷凍した。219の粘液質組織を混合器によつてpH 7.5のトリス塩酸塩5.0ミリモル、グアニジン塩酸塩8Mおよびジチオスレイトール1ミリモルとからなる緩衝液(10°C)200mlの中に崩解させた。不溶性物質をソルバル(sorval)SA-600回転子の中に10,000rpmで12分間遠心分離により除去した。スピノからの上澄液200mlに氷冷無水エタノール100mlを添加した。-20°Cで1.5時間後、沈殿を-10°Cで30分間3000rpmで遠心分離によりペレット化した。ペレットをEGTA 2.0ミリモル、pH 7のNaOAc 2.0ミリモル、pH 7のグアニジン塩酸塩8モル及びジチオスレイトール1ミリモルよりなる氷冷緩衝液(EGAD)に溶解した。冷凍無水エタノール2.0ml

を添加し、溶液を-20℃に45分間放置した。沈殿は-10℃で20分間3000 rpmで遠心分離によりペレット化した。ペレットは40 mlの冷EGAD緩衝液中に再溶解し、冷エタノール20 mlによる沈殿、遠心分離及びEGAD緩衝液中に於けるペレットの再溶解を更に2回反復した。最後にペレットをpH 7、20ミリモルのEDTA 1.6 mlに溶解しクロロホルム：イソブタノール(4:1)により3回抽出した。次に、2容積の4.5モルpH 5.2のNaOAcを水槽に添加し、溶液は-20℃で一夜放置した。RNAの沈殿は-10℃で10,000 rpmで25分間遠心分離により収集し、水30 ml中に溶解した。収量はRNA 4.5 mgであった。RNAはpH 5の2モルのNaOAc 1 ml及び無水エタノール7.5 mlの添加により沈殿させ、続いて-20℃で一夜培養した。RNAは遠心分離(10,000 rpm, -10℃ 10分)によりペレット化し、水20 mlに再溶解し、60℃に10分間加熱し、氷上で迅速に冷却し2倍の濃度の結合緩衝液(pH 7.5のトリス塩酸塩20ミリモル、

pH 7 の 2 ミリモルの EDTA、0.4 % SDS 及び NaCl 0.24 モル) で希釈した。RNA を 4 mL のオリゴー-dT-セルロースカラムに添加し、カラムを 1 倍濃度の結合緩衝液 4.5 mL で洗浄し、次いで塩を含まぬ結合緩衝液でカラムを洗浄することにより poly A- 含有 RNA を溶離した。約 1 μg の poly A- 含有 RNA が得られた。poly A 含有 RNA の 1 部を試験管内でうさぎの網状赤血球溶解液系に翻訳した (エッチ・アール・ビー・ペルハム (H.R.B.Pelham) 及びアール・ジェ・ジャクソン (R.J.Jackson) (1976) (Eur.J.Biochem. 67, 247-256)。タンパク質生成物は 10 % ポリアクリルアミドゲル上で分析した。主要の单一タンパク質バンドが観察され、これはレンニン mRNA が poly A- 含有 RNA 中に存在することを示すレンニン抗血清により沈殿した。

2. 二重鎖複写 DNA (cDNA) の製造

cDNA 約 8.7 μg を子牛の胃 poly A- 含有 RNA 20 μg から逆トランスクリプターゼ 100 単位及び 1 Ci/ミリモル $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP を含有する

pH 8.3 のトリス・塩酸塩 5.0 ミリモル、MgCl₂ 8 ミリモル、ジチオスレイトール 0.4 ミリモル、各デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 1 ミリモル、オリゴ(-dT)₁₂₋₁₈ 2.0 μg/mL 中で 42 °C で 1 時間培養することにより合成した。反応混合物を 100 °C で 30 分間加熱した後氷上で 3 分間冷却し、遠心分離により沈殿したタンパク質を除去し上澄液物質の半量に pH 6.9 のヘプス KOH 100 ミリモル迄、MgCl₂ 5 ミリモル迄、ジチオスレイトール 0.5 ミリモル迄、デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 0.12 ミリモルを添加した。この混合物を 300 単位の 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I により 16 °C で 2 時間倍養し二重鎖 cDNA 8.6 μg を生産した。DNA はエタノール抽出しセファデックス G-100 上でクロマトグラフィにより混合しない 3 リン酸塩から分離した (1.2 mL カラム、0.7 cm × 3.0 cm, pH 7.5 のトリス・塩酸塩を 2.0 ミリモル、EDTA 0.5 ミリモルにより溶離した)、かつ pH 5 の 2 モルの NaOAc 1/10 容量及び冷エタノール 2.5 容量を添加し -20 °C で一夜

エタノール沈殿を行つた。2 重鎖 cDNA (4.6 μg) を次に 37 °C で 1 時間緩衝液 S (NaCl 0.3 モル, pH 4.6 の NaOAc 3.0 ミリモル, ZnSO₄ 3 ミリモル) 中で 1000 単位の S₁ ヌクレアーゼで処理した。反応は EDTA 1.0 ミリモル迄、pH 8.3 のトリス・塩酸塩 2.00 ミリモル迄を添加して終結させ、混合物をビオグル A-150 mL カラム (0.7 cm × 3.3 cm) に加え pH 7.5 のトリス・塩酸塩 1.0 ミリモル、EDTA 1 ミリモル及び NaCl 2.50 ミリモルにより平衡かつ溶離した。大分子量 DNA のピークの留分 (各 0.5 mL) はプールし、かつ pH 5 の NaOAc 2 モル 1/10 容量及び冷無水エタノール 2.5 容量を添加しエタノール沈殿させた。

3. Hind III 結鎖剤の付加

S₁ 処理した二重鎖 cDNA (1.7 μg) を緩衝液 T (pH 8, のトリス・塩酸塩 2.5 ミリモル、MgCl₂ 6.6 ミリモル、EDTA 0.5 ミリモル、2-メルカプトエタノール 5 ミリモル及び各デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 0.5 ミリモル) 中で

T₄ DNA ポリメラーゼ 2 単位により室温で 30 分間培養した。この物質をエタノール抽出し、pH 5、2 モルの NaOAc 1/10 容量及びエタノール 2.5 容量を添加しエタノール沈殿した。プラント終了 2 重鎖 cDNA は次に pH 7.6 のトリス・塩酸塩 6.6 ミリモル、MgCl₂ 6.6 ミリモル、2-メルカプトエタノール 5 ミリモル、ATP 0.5 ミリモル中で 300 p モルの ³²P-標識 Hind III 合成結鎖剤 (cDNA 末端に 100 倍過剰) 及びプラント終了 9 単位の T₄ DNA リガーゼ迄より 12 °C で一夜培養した。

反応は EDTA 1.0 ミリモル pH 8 に調節し、ビオグル A-150 mL カラム (0.7 cm × 2.0 cm) 上で分離した。高分子量 DNA 含有留分をプールし、エタノール沈殿した。この物質は pH 7.6 のトリス・塩酸塩 5.6 ミリモル、MgCl₂ 5.6 ミリモル中で Hind III 制限エンドヌクレアーゼ (9 単位) により 37 °C で 45 分間処理し、次いでエタノール抽出し、pH 5 の 1 モルの NaOAc 1/10 容量及び無水ツルコール 2.5 容量を添加しエタノール

特開昭60- 58077(31)

沈殿した。HindIII 條集末端を有する二重鎖cDNAは次に HindIII 制限エンドヌクレアーゼにより切り開かれた $f\beta$ フアージ CGF₄ 二重鎖DNAに結縫され、エツチ・グッドマン (H. Goodman) 及びアール・ジェ・マクドナルド (R. J. McDonald) の方法 (H. M. Goodman and R. J. MacDonald, *Methods in Enzymology*, 68, 75-91 (1979) により牛の腸のホスファターゼにより2回処理し末端リン酸塩を除去した(註: フアージ CGF₄ を製造するため、 $f\beta$ フアージ R229 [ジェ・ディ・ベッケ (J. D. Boecke), *Mol. Gen. Genet.* 181, 288-291 (1981)] は EcoRI エンドヌクレアーゼにより切断し T₄ DNA ポリメラーゼによりプラント終了しまサチニセット州ウォルサムのコラボラチブ・リサーチ社からの HindIII 合成オリゴヌクレオチド結縫剤により結縫した)。結縫反応液は pH 7.6 のトリス・塩酸塩 6.6 ミリモル、MgCl₂ 6.6 ミリモル、メルカプトエタノール 5 ミリモル、二重鎖 cDNA 0.3 μ g、CGF₄ DNA 0.2 μ g、ATP 0.5 ミリモル及び綿集末端 300

単位の T₄ DNA リガーゼを包含した。結縫は 16 ℃で 29 時間であった。

4. 組換え - CGF₄ DNA による大腸菌 BNN45 のトランスフェクション

大腸菌系統の CGE6 (BNN45; *hsdR*⁻, *hsdM*⁺, *supE*, *supF*, *BL*⁻, *met*⁻) はトリプトンプロス中で 37 ℃で振盪しつゝ増殖させ、4 ℃で 7000 rpm で 10 分間遠心分離により OD₇₀₀ = 0.5 で回収した。細胞は氷冷 CaCl₂ 5.0 ミリモル中 (元の培養容量の 2 分の 1) で再懸濁し、0 ℃で 30 分間静置させた。懸濁液は次に 4 ℃で 10 分間 7000 rpm で遠心分離し元の培養容量の 1/20 の氷冷 CaCl₂ 5.0 ミリモル中に再懸濁させた。0 ℃で 60 分間放置した後、細胞をトランスフェクションの為に使用した。2.0 μ g 結縫反応物の 2 分の 1 ミリリットルを pH 7.6 の 5.0 ミリモルの無菌トリス・塩酸塩 5.0 μ g を包含する 8 本の各々の試験管に添加した。CaCl₂ 処理細胞の 10 分の 1 ミリリットルを各管に添加し、混合物を氷上に 30 分間静置した。37 ℃に 2 分間加温

した後、0.2 μ l の CGE5 (J. M101: ジエ・メッシング (J. Messeing (1979), *Ftra D36 pro AB lac IZΔM15 in a Δ(lac pro) SupE⁺ hi⁻ background*) を一夜培養し、0.7 ml の柔かな寒天 3 μ l を加え混合物を 8 本のトリプトン寒天プレート上に注加した。37 ℃一夜培養してプレート当たり約 250 理点が生成した。

5. レンニンコード付け配列を保有する組換え CGF₄ の同定

プラックをニトロセルロースに移植しベントン及びダビス (W. D. BenTon and R. W. Davis (1977) *science*, 196, 180-182) により記載された如く $\alpha^{32}P$ -dCTP 及び逆トランスクリプターゼ (T. P. st. John and R. W. Davis (1979) *Cell*, 16, 443-452) を使用する子牛の腎ポリ A 含有 RNA から製造した ³²P 標識 cDNA を使用し試験した。標識 cDNA に強くハイブリッド形成した約 80 の組換えフアージをプレートから取り T Y 媒体中に 4 ℃で貯蔵した。完全なフアージの試料を CGE5 細胞上で一夜増殖し

て増幅し、遠心分離により回収し、pH 9.5 のトリス・グリレン 0.37 モルを含有する 2 % のアガロースグル中で電気泳動にかけ、0.2 規定の NaOH 中に 1 時間処理し、かつ pH 7.4 のトリス・塩酸塩 0.5 モル中で中和した後、臭化エチジウムで染色した。遊走はフアージ DNA の大きさの対数に逆比例し、大きさ 1000-2000 ベースの対の挿入 DNA を伴なう 8 フアージの選択ができた。2 重鎖 RF DNA はこれらの 8 フアージからモーセス等の方法 (P. B. Moses, J. D. Boecke, K. Horiuchi, N. D. Zinder (1980) *Virology*, 104, 267) により製造した。この DNA は HindIII で切断し、得られたフラグメントはアガロースグル上で分析し挿入が HindIII 部位にあり、予期した大きさであることを確認した。最後に、4 個の組換えフアージからの DNA (各々から約 5-10 μ g) 及び媒介 CGF₄ からの DNA を HindIII で切断し、フラグメントは 4.5 分間沸騰し、ドライアイス/エタノール中で冷凍することにより変性した後、20 倍の SSC で予備処理し

乾燥したニトロセルロースの小片上に水中のDNAを点滴することによりニトロセルロースに結合させた。真空中で7.5°Cで1.5時間焼成した後ニトロセルロースに結合したDNAはミラー等により記載されたハイブリッド選択法により(J.S.

Miller, H.P., Ricciardi, B.E., Roberts, B., M.Paterson, N.B.Mathews (1980) J.Mol.Biol., 142, 455-488) 各々のハイブリッド形成にポリA-の豊富な子牛の胃のRNA 2 μ g を使用して実施した。溶離したRNAは次にペルハム及びジャクソンの方法により (H.R.Pelham, R.J.Jackson (1976) Eur.J.Biochem. 67 247-256) 35 S-メチオニンで標識した網状赤血球溶解質系に翻訳し、得られたタビパク質生成物はレムリイ (U.Laemmli (1970) Nature

227 680-685) 0.1% SOS を含有する 10
% のポリアクリルアミドゲル上で分析した。ゲル
分析の結果は試験したフアージ DNAs の 4 個全て
は選択した 4 種全体がうさぎの網状赤血球溶解質
に翻訳中に大きさ及び免疫学的規準においてプレ

一プロレニンに同一なタンパク質製品を生ずる RNA 系を選択したのでレニン mRNA にハイブリッド形成したことを示した。4 種の中 2 種、約 1400 ペア (δp) の挿入を有する 293-207 及び約 1250 δp の挿入を有する 293-118/37 が将来の研究のため選択された。DNA 挿入はマキサム及びギルバートの方法により配列された (S.M.Maxam and W.Gilbert(1980))

Methods in Enzymology, 68, 499-560).

スクレオチド 205 から 1350 まではプレープロ
ブレニン A 遺伝子に対する D N A 配列である（第
9 表参照）スクレオチドの配列 1-204 及び
1351-1460 はプレープロブレニンに付着され
るがもし望ましければ除去でき式中の遺伝子の利
用には重要でない。第 9 表の D N A 物質の有用な
部分は分離し、かつ既知の技術で利用できる。

表 9

この表には293-207两者からの情報が組合せられている。即ち組換えフアージ293-207は削除されるヌクレオチド848-961を除いて第9表に示された配列を帯びる挿入部をヌクレオチド1番から少なくともヌクレオチド1360番まで保有しているが、フアージ293-118/37はヌクレオチド229番からヌクレオチド1460番迄の配列を帯びる挿入部を保有する。配列した結果により示された如く、レニン合成の開始はメチオニンコード(ヌクレオチド205-207)に起り精製プロレニンに比較し更に付加した16のアミノ酸を持つブレープロレニンを生ずる。(プロプロレニンBアミノ酸配列はビー・フォルトマン等(*B. Foltman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2321-2324 (1977)*及びビー・フォルトマン等(*B. Foltman et al., J. Biol. Chem. 254, 8447-8456 (1979)*)により発表された。即ち、第9表のヌクレオチド配列データはブレープロレニンの存在の最初の表示である。2種の組換えf&フアージ293-

207及び293-118/37は共に全ブレープロレニンA分子に對しDNAの配列を保有する。ブレープロレニンAのプロレニン部分はアミノ酸290番に於けるプロレニンBとは異なる(フォルトマン等(上記参照)により記載された如くレニンA中のアバラギン酸塩及びレニンB中のグリシン、即ちアミノ酸の位置番号はフォルトマンのそれである)。アバラギンコードンはアミノ酸位置204番に示されたが、フォルトマンはその位置にアバラギン酸塩を報告した。然しながら、これはアバラギン酸塩及びグルタミン酸塩のアミドはそれらの酸形態と區別することは困難であるからアミノ酸配列の誤りであるが、ヌクレオチドの配列は容易にそのコードンを容易に區別できる。

フアージ293-118/37により代表されるクローンのレニン遺伝子はウシゲノムの複写またはレニン遺伝子の複写の性質を調査するのに使用された。これらの実験は種々の制限酵素はより切断し、アガローズゲルにより分離し、サウザー

ンの方法(*E.M. Southern [1975] J. Mol. Biol. 98 503-517*)により翻訳したウシDNAに對し刻み目-翻訳の方法(*P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg [1977] J. Mol. Biol. 113, 327-351*)により³²Pにより標識したクローンのレニンcDNAをハイブリッド形成することにより実施した。その結果はクローンのブレープロレニンcDNA配列を切断しないSac I及びBgl Iの如き酵素によるウシDNAの制限エンドヌクレアーゼの開列はそれに拘わらずレニン配列にハイブリッド形成するDNAの1以上のバンドを産み生ずることを示した。これは(a)レニン情報のゲノムの複写が更にDNAを包含し、恐らくレニンcDNAには見出されない制限酵素位置を含有する配列が介存するか、(b)1個以上のレニン遺伝子が複写間で切断したゲノム及び制限酵素中に存在することを示唆している。後者の可能性はクローンのレニンcDNAの5'及び3'末端から誘導された³²P標識した検体と制限切断ウシゲノムのDNAをハイブ

リッド形成することにより除去された。例えば制限エンドヌクレアーゼEcoRI及びBamHを使用したこれらの結果はレニンコード付け情報の单一のゲノム複写と一致した。これはビ、フォルトマン等により観察されたレニンのA及びB形態(*J. Biol. Chem. 254, 8447-8456 [1979]*)がレニン遺伝子の2種の異なる対立遺伝子の製品に最も類似することを意味する。更にレニン遺伝子のウシゲノムの複写は介在する配列を含有し、その観点でゲノムの複写はブレープロレニンに對する伝令RNAに一致する我々のクローンのcDNAと異なる。

6. 酵母におけるプロレニンの表現法

組換えf&フアージCGF293-207 RF I DNA(40μg)をHindIII(N.E.生物研, 15単位)及びBglII(N.E.生物研, 14単位)により前記の如く103μgの反応容積で37℃で1時間切断した。制限カットDNAを予備の水平のアガローズゲルに添加し³²P 293-207の435のピースを切り取りアガローズ切片を冷凍し粉碎

することにより溶離した。エタノール沈殿をさせた後、DNAは水に再溶解し、約1 μ gをHha I (N.E. 生物研, 0.06単位)により37°Cで15分間部分的に切断してPR発端培養を含有する190 bp Hha I ~ Bgl II 切片を得た。このDNAフラグメントを前記の如くゲルにより単離し、pH 7.5のTris-HCl 6.0ミリモル、MgCl₂ 8ミリモル、ジチオスレイトール1.0ミリモル及び各デオキシヌクレオチド3リン酸塩0.2ミリモルを含有する反応液3.0 μ l中でDNAポリメラーゼI (Boehringer Mannheim, 1.4単位)により室温で30分間処理することによりプラント終了させた。DNAはエタノール抽出し、エタノール沈殿した。

ATGG (例えばCCATCTAGATGG)で終るXba I制限エンドヌクレアーゼ配列を保持する合成オリゴヌクレオチドはコラボラティブ・リサーチ社によるトリエステル法 (K. ITakura 等, J. Biol. Chem., 250 4592 [1975])により合成し、5 μ gを6単位のT₄ポリヌクレオチドキナーゼ

(P-L Biochemicals)を使用しpH 7.6のTris-HCl, MgCl₂ 1.0ミリモル、2メルカプトエタノール1.0ミリモル及び2ロモルのATPを含有する反応液3.5 μ l中でX³²P-ATPICによりキナーゼ化した。この5'-保護オリゴヌクレオチド (2.2 P-モル末端)を約0.5 pモルの190 bpフラグメントに緩衝液プラス500単位のT₄DNAリガーゼ (N.E. 生物研)と共に添加した。反応液は15°Cで1時間次に4°Cで一夜培養し、次いでNaCl 1.8ミリモル、MgCl₂ 7ミリモル及びpH 8のTris 5ミリモルの4容量で希釈した。65°Cで5分間加熱した後、1.2単位のXba I 制限エンドヌクレアーゼ (1.5時間の全消化に対し1時間後IC更に5単位を添加した)で処理した。最後にオリゴヌクレオチド単量体を結離した190 bp DNAからゲル電気泳動 (7%アクリルアミド・ゲル)により除去した。DNAフラグメントはアクリルアミド切片から緩衝液中に24時間浸漬することにより溶離した。DNAはエタノール沈殿させ、水1.5 μ lに再溶解し、

Xba I の位置で開口したCGF12-f8媒体を含有する結紮反応液中で培養し、次いで前記のようにアルカリ性ホスファターゼで処理した。結紮反応のアリコートを上記の如くLG90系の形質変換適格細胞に使用した。形質変換細胞をf8感能細胞 (JM101)を含有するトリプトーン-酵母抽出ペレート上に置いた。多数のファージplaquesを採取し、各々の培養株を少量のFR1-DNAを与えるまで増殖した。制限エンドヌクレアーゼ消化 (Xba I 及びHae III) 及びアガローズゲル電気泳動は若干のファージクロンは望ましい190 bp フラグメントを望ましい配位 (CGF12の1個のEcoRI 位置に隣接するプロレンニン遺伝子の5'-末端)に保有した。かく1個の単離体をCGF21と称した。

約1.0 μ gのCGF21DNAを前記の反応液4.0 μ l中でPst I (N.E. 生物研, 1.0単位)により37°Cで45分間切断した。100 bp Pst I/EcoRI フラグメントをアクリルアミドゲルICにより単離した。プラスミドpBR322 (8 μ g

まで)を反応容量3.0 μ l中でEcoRI (N.E. 生物研, 7.5単位)及びHind III (N.E. 生物研; 7.5単位)により37°Cで1時間切断した。得られたHind III/EcoRI フラグメント (4.3 Kb)はアガローズゲルで精製した。CGF293-118/37 DNA (1.0 μ g)は反応容量3.0 μ l中でPst I (N.E. 生物研, 8単位)及びHind III (N.E. 生物研, 1.0単位)により37°Cで1時間切断した。1.1 kb Pst I/Hind III DNA フラグメントはアガロースゲルにより精製した。3個のDNAフラグメントを3-分子結合反応液中に加えpCG68を生じた。3分子結合 (反応容量2.7 μ l)は等モル比の3フラグメント合計1.5 μ g DNAを含有した。結紮反応を400単位のT₄DNAリガーゼ (N.E. 生物研)により12°Cで8時間実施した。結紮反応のアリコートは記載したようにしL392系の形質変換適格細胞に使用した。制限酵素消化 (Pst I, Xba I, Bgl II 及びKpn I) 及びアガロースゲルによるプラスミドDNAの分析は若干の単離体が望ましいプラス

特開昭60- 58077(35)

ミド pCGE68 を保有した。このプラスミドは DNA コード付けする Met-プロレンニンを含有する。

pCGE68 DNA (10 μ g) は XbaI (N.E. 生物研, 10 単位) により 37°C で 2 時間切断した。エタノールによる沈殿後、Sac I ネクレアーゼ (30 単位) で 37°C で 30 分間の処理によりプランクを終了させた。エタノール抽出及びエタノール予備沈殿の後、DNA を 5'-加リン酸反応した Sal I 結鎖剤 (コラボラティブ・リサーチ社, 2.5 μ g) により培養した。結鎖剤は pH 7.6 Tris-HCl 1.0 ミリモル、MgCl₂ 1.0 ミリモル、2-メルカプトエタノール 1.0 ミリモル及び ATP 0.12 n モルを含有する反応液 1.0 μ l 中で 2.5 単位の T₄ ポリヌクレオチドキナーゼ (P-L バイオケミカル) を使用し、 γ -³²P-ATP によりキナゼ化している。結鎖剤は反応液 2.5 μ l 中プラント終了 pCGE68 DNA に 14°C で 8 時間結紮した。得られた結紮された DNA 含有 Sal I 結鎖剤は BNN45 株の形質転換適格細胞に使用した。制

限酵素 (Sal I) 及びアガロースゲルは所望のプラスミド、pCGE91 を確認するのに使用した。

酵母におけるプロレンニンの組立を新しく開始した。問題の第 1 酵母媒介体、pCGS128 は 3 切片の結紮から作成した。最初に pCGE91 を Sal I (N.E. 生物研, 10 単位) により 37°C で 3 時間切断した。この DNA フラグメントは次に pH 7.5 Tris-HCl 1.0 ミリモル、MgCl₂ 8 ミリモル、ジチオスレイトール 1.0 ミリモル及び 0.2 ミリモルの各デオキシヌクレオチドを含有する反応液 5.0 μ l 中で DNA ポリメラーゼ I (ペーリンガー/マンハイム, 10 単位) により室温で 1 時間の処理でプラントを終了した。プラント終了 DNA は次にエタノール沈殿し再溶解し Hind III (N.E. 生物研, 7.5 単位) で 37°C で 1 時間切断した。1200 bp プラント終了 Sal I / Hind III DNA フラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した。シヤトル媒介体の必要な成分を含有する次の DNA フラグメントは cCGS40 から精製した。この後者の媒介体は Eco RI

及び Hind III により切断され、得られた 7000 bp フラグメントはアガロースゲル電気泳動により精製した。Bam HI により切断された pBM125 (スタンホード大学アール・デービス (R. Davis) の好意) から得られた P_{GAL} プロモーターを含有する第 3 DNA フラグメントは DNA ポリメラーゼ I プラス全 4 デオキシヌクレオチド 3 リン酸塩でプラントし、次いで Eco RI で切断し、P_{GAL} 125 と名付けられた 820 bp 切片を生じた。プロモーターの長さを西くヌクレオチド配列は第 1 表に示した。DNA の 3 切片 (pCGE91, プラント終了 Sal I / Hind III からの 1200 bp, pCGS40 Eco RI / Hind III からの 7000 bp 及び P_{GAL} 125 からの 820 bp) を T₄ DNA リガーゼ (コラボラティブ・リサーチ社、プラント終了 2 単位) 及び適当な緩衝液及び ATP を含有する反応液 2.5 μ l 中で等モル量のフラグメントを使用して互に結紮し、14°C で 18 時間培養した。

結紮した DNA は菌株 CGE129 の適格細胞を転換するのに使用した。制限酵素消化及びアガ

ロースゲルによるプラスミド DNA の分析は所望のプラスミド CGY150 を保有する単離体を示した。pCGS128 の DNA は酵母菌株 CGY150 を転換するのに使用した。変換したスフェロプラスターを選択した。酵母菌株はプロレンニン (~ 0.02%) を保有することを示した。

プロレンニンの表現を増加するため更に組立を実施した。pCGS128 DNA を Hind III により切断した。Suc2 遺伝子の 3' 末端からのフラグメントは Hind III により切断し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I によりプラント終了を作成し次いで Sal I 結鎖剤が結紮された。得られたフラグメントは Sal I 及び Bam HI 及び Sal I で切断された pCGS40 中に結紮されたゲル精製 1 kb DNA フラグメントを生成した。

得られたベクトル、pCGS108 を Hpa I 及び Sal I で切断し大腸菌 DNA ポリメラーゼ I でプラントを作成しゲル精製した。Hind III 結鎖剤 (コラボラティブ・リサーチ、長さ 1.0 ヌクレオチド) が次に Hind III で切断された DNA フラグメントを生成した。

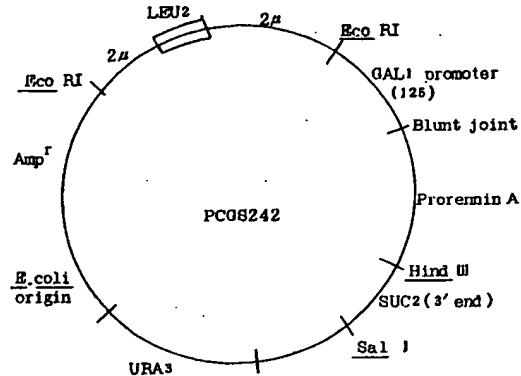
メントに結縫され、ゲル精製されて pCGS128 の Hind III 位置に結縫されて pCGS108 を生産する 650 bp フラグメントを生産した。

1 部の EcoRI 及び Sal I 切片は pCGS16.8 媒介体よりなり、P_{GAL}125 及びプロレンニンを含有する 2.6 kb DNA フラグメントを単離した。1 部の EcoRI 切片は 2 μ DNA フラグメント上に LEU2 遺伝子を含有するゲル精製した 2.3 kb フラグメントを生成する PJDB219 から製造された。これらの 2 個の DNA フラグメントは共に EcoRI / Sal I 消化により Y_Ep5 (URA₃ が pCGS241 及び pCGS242 を生成する選択を含む) に結縫された。(第 10 表) 構造における差異は 2.3 kb フラグメントの 2 つの配位に依る。両ベクトルは別々に形質変換 CGY150 に使用された。制限酵素消化及びアガロースゲルによるプラスミド DNA の分析は西部分析によるプロブレンニン表現の水準をもつ所望のプラスミドが 0.2 % の可溶性タンパク質に増加したことを示した。そのタンパク質はレンニンに変換後、乳汁製

塊活性を示した。

プラスミド pCGS242 を保有する菌株 CGY461 はアメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に寄託中であり、1983 年 2 月に寄託した。受入番号 20662。

第 10 表



実施例 4

この実験には実施例 3 の工程 1 - 5 を反復した。

6. 酵母中のプレプロレンニンの表現

組換え体 $f\beta$ ファージ CGF293/207FRIDNA (20 μ g) は反応液 100 μ g 中で Ava II (N.E. 生物研, 5 単位) により切断した。256 bp Ava II フラグメントはゲル電気泳動により精製し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントによりブラン終了フラグメントを作つた。フェノール抽出及びエタノール沈殿の後、DNA は Hind III 結縫剤 (コラボラチブ・リサーチ, CAAGCTTG) により結縫し、次に Hind III (N.E. 生物研, 15 単位) 及び Bgl II (N.E. 生物研, 3.6 単位) により切断した。245 bp フラグメントはプレプロレンニン遺伝子の一部を包含するゲル電気泳動により精製した。プラスミド pCGS28DNA [ビー・アルフオード (B. Alford) 等により 1981 年 12 月 1 日出願した米国特許出願番号第 325,481 号] は Bgl II (N.E. 生物研, 5 単位) 及び Sal I (N.E. 生物研, 10 単位) に

より切断し残部のプレプロレンニン遺伝子を含有する 1000 bp DNA フラグメントはゲルにより精製した。これら 2 個の DNA フラグメントは互に Hind III (N.E. 生物研, 12 単位) 及び Sal I (N.E. 生物研, 8 単位) により切断した PBR322 により結縫した。この媒介体は形質変換適格性大腸菌細胞に使用され、多数の大腸菌クローニングからのプラスミド DNA の得られた制限酵素分析は大腸菌種 CGE130 中に所望のプラスミド pCGE63 を示した。

プレプロレンニン遺伝子は P_{GAL}126 であるプレプロレンニンである pCGE3DNA を組立てるのに使用した。プラスミド pCGE63DNA により Hind III 及び Sal I により切断しプレプロレンニン DNA を含有する 1200 bp フラグメントを得た。EcoRI / Hind III の 2 重消化は Pac 2 を含有する 850 bp フラグメントを得るため pRB118 に実施した。これらのフラグメントは記載した 3 分子反応液中でシャトル媒介体の特性を取り入れる pCGS40 の Eco RI / Sal I フラグメン

トにより結合した。この混合物は形質変換適格性の CGE129 大腸菌細胞に使用した。所望のプラスミド pCGS64 を保有する大腸菌のクローンは多數の被変換体からのプラスミド DNA の制限消化により同定した。

pCGS64 の Bgl II / Sal I フラグメント (~9 kb) はゲル電気泳動により精製しプレプロレンニン遺伝子並びに pCGS Eco RI / Sal I フラグメントの一部を含有した。大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプレプロレンニン遺伝子の水蒸気中で Sma I 位置で融合したプレプロレンニンの残分を含有する pCGE74 の Bgl II / Xba I 13600 bp フラグメントは pCGS64 からの一片に結合した。形質変換を実施し、制限分析は所望の酵母プラスミド pCGS81 の存在を示した。

Psuc 2 は最初に Hind III による制限により、続いて大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントにより充填することにより pCGS81 から除去した。開口したプラスミドは次に Eco RI により制限し、大フラグメント マイナス Psuc

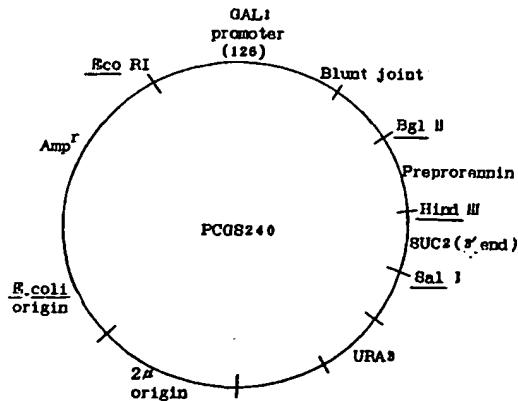
2 をゲル精製した。pGAL126 は pBM126 (アール・デービス、スタンフォード大学の好意) の制限により取得した。プラスミド pBM126 は Bam H I により切断し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントで充填し、ついで Eco RI により切断し所望の 750 bp pGAL126 を得た。これら 2 個のフラグメントは互に結合して pGAL126 プレプロレンニン'Z (茲'Z は 1 部の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を表わす) を含有する pCGS148 を得た。

DNA の 1000 bp の 1 片は pCGS148 を Eco RI 及び Bgl II による消化により得た。更に pCGS168 の Bgl II / Sal I 1800 bp はゲル精製した。これら 2 個のフラグメントは刺繡の pCGS40 の 8 kb Eco RI / Sal I フラグメントに結合した。適格性の大腸菌 CGE129 の形質変換を実施して制限分析は所望のプラスミド pCGS240 を所有するクローンを示した。pCGS240 を所有する大腸菌から製造したプラスミド DNA は酵母菌株 CGY150 を形質変換するのに使用し

た。酵母菌株 CGY457 はその形質変換から得られプラスミド pCGS240 を保有する。レンニン抗体による西欧のハイブリッド形成により実証されたように GAL4 促進剤からのタンパクの表現の水準は可溶性タンパク質 0.2 迄であった。

プラスミド pCGS240 を帯びた菌株 CGY457 はアメリカン タイプ カルチャーコレクション (ATCC) に寄託中で、1983年2月に寄託し受付番号は 20661 である。

第 2 表



本発明の特徴の態様が明示され、かつ記載されているが、多くの変化が可能である。例えば本発明は主としてウシ生長ホルモン、インテフェロン、プロレンニン及び酵母中のプレープロレンニンの如きポリペプチドの製造における GAL4 促進剤の使用に関するものである。明らかに、他のタンパク質製品は規定された操作関係において本発明の GAL4 促進剤を使用して取得し、かつ表現できる。かかるポリペプチドは酵素または他の生物学的に活性タンパク質である。前記実施例はかかる機構の操作の実例である。

代理人 弁理士(8107) 佐々木清隆
(ほか 3 名)

第1頁の続き

⑥Int.Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 1/16
 C 12 R 1:865)
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:865)

⑦発明者 ジエラルド・ラルフ・
 フИНК
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02167、ブルックリ
 ン、アストン・ロード 40

⑦発明者 アリソン・タウント
 ン・リグビー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01773、リンコル
 ン、ファーレア・ロード (番地なし)

⑦発明者 ロバート・ジェントリ
 ー・ノウルトン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02173、レキシント
 ン、シャーレイ・ストリート 30

⑦発明者 ジエン・イ・マオ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01730、ベッドフォ
 ード、ゴールド・ロード 35

⑦発明者 ドナルド・ティラー・
 モア
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01730、ウォルサ
 ム、ヴァージニア・ロード 39

⑦発明者 クリストファー・ゴツ
 ドフリー・ゴフ
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア 19041、ハヴアーフ
 オード、ナンバー・ツー・カレッジ・アヴェニュー 773

手 続 换 正 書

昭和 59 年 5 月 51 日

特許庁長官印

特許庁審査官



1. 事件の表示

昭和 59 年特許願第 55472 号

2. 発明の名称

GAL 1 酵母菌プロモーターの使用

3. 補正をする者

事件との関係: 特許出願人

名 称 コラボラティヴ・リサーチ・インコーポレイテッド

4. 代理人

住 所 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル 29 段
 霞が関ビル内郵便局、私書箱第 49 号

栄光特許事務所 電話 (501)-9601 (代表)

氏 名 弁理士 (8107) 佐々木 清 隆 (ほか 3 名)



5. 補正命令の日付 (自発)



6. 補正により増加する発明の数 0

7. 補正の対象

1) 特許出願人の代表者を記載した適正な顔書

2) タイプ印書による明細書の添書 3) 代理権を証明する書面

8. 補正の内容

1), 2), 3) 共に別紙の通り (ただし、2) は内容に変更なし)

Citation G1 yeast promoter linked to non galactokinase genePatent Number: US4661454

Publication date: 1987-04-28

Inventor(s): KNOWLTON ROBERT G (US); FINK GERALD R (US); MAO JEN-I (US); MOIR DONALD T (US); BOTSTEIN DAVID (US); DAVIS RONALD W (US); GOFF CHRISTOPHER G (US); TAUNTON-RIGBY ALISON (US)

Applicant(s): COLLABORATIVE RES INC (US)

Requested Patent: JP60058077

Application Number: US19830470911 19830228

Priority Number (s): US19830470911 19830228

IPC Classification: C12N1/18; C12N15/00; C12N1/00; C07H15/12

EC Classification: C07K14/56, C07K14/61, C12N9/64F2C23M1, C12N15/66, C12N15/81Equivalents: CA1273883, CA1283373, DE3484689D, DK97784, EP0123811, A3, B1, GB2137208

Abstract

A DNA segment containing a GAL1 promoter linked to a gene other than the galactokinase gene for directing the expression of the gene within a yeast cell.

Data supplied from the esp@cenet database - I2